



TITLE:

山羊精液中の卵黄凝固酵素に関する研究(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

入谷, 明

CITATION:

入谷, 明. 山羊精液中の卵黄凝固酵素に関する研究. 京都大学, 1964, 農学博士

ISSUE DATE:

1964-06-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.r326>

RIGHT:

山羊精液中の卵黄凝固酵素に関する研究

入 谷 明

目 次

第1章 緒 論	1
第2章 山羊稀釈精液の凝固現象と山羊精液における特殊性	2
第1節 緒 言	2
第2節 凝固現象の所見と山羊精液における特殊性	2
第3節 稀釈液の種類と凝固の有無	5
第4節 摘 要	6
第3章 凝固要因の性質	7
第1節 緒 言	7
第2節 温度と凝固活性度	7
第3節 pH と凝固活性度	11
第4節 卵黄濃度と凝固活性度	12
第5節 凝固要因の濃度と凝固度	14
第6節 各種塩類, 金属イオン, その他2,3の薬剤添加が凝固活性度に およぼす影響	16
第7節 摘 要	20
第4章 凝固現象の強度と関連ある2, 3の条件	22
第1節 緒 言	22
第2節 山羊の個体, 採取季節, 採取回次による酵素活性度の変異	22
第3節 精液の枯渇採取と精液中の酵素活性度	29
第4節 電気刺激による採取精液の酵素活性度	33
第5節 摘 要	38
第5章 射出精液ならびに副生殖腺液の一般性状ならびに化学的組成と凝固 酵素の存在との関連性の有無	40
第1節 緒 言	40
第2節 山羊の射出精液の一般性状	40
第3節 射出精液の化学的性状	42
第4節 山羊副生殖腺液の化学的性状	47
第5節 摘 要	50
第6章 凝固酵素の所在と由来	52

第1節 緒言	52
第2節 各種生殖器官組織における凝固酵素の有無	52
第3節 尿道球腺の剔除と精液中の凝固酵素活性度	54
第4節 尿道球腺組織における凝固酵素の組織化学的検索	59
第5節 摘要	61
第7章 卵黄凝固酵素の精製	63
第1節 緒言	63
第2節 塩析法による精製	63
第3節 燐酸カルシウムゲルを使用する分別吸着法による精製	64
第4節 アセトン分別沈澱法による精製	67
第5節 摘要	70
第8章 凝固酵素の卵黄に対する作用位置と酵素の種類の推定	71
第1節 緒言	71
第2節 凝固にともなう卵黄の化学的变化	71
第3節 遊離脂肪酸とグリセロ燐脂質のペーパークロマトグラフィー	78
第4節 摘要	83
第9章 凝固発現の機序と凝固時の精子死滅の原因	84
第1節 緒言	84
第2節 凝固発現の機序	84
第3節 白濁凝固にともなう保存精子の死滅の原因	90
第4節 摘要	96
第10章 卵黄緩衝液による稀釈山羊精液の保存中における凝固防止の方法	97
第1節 緒言	97
第2節 精子の洗滌による凝固防止	97
第3節 卵黄分割による非洗滌精液の保存	99
第4節 摘要	101
第11章 総括	103
引用文献	109
英文摘要	115

第 1 章 緒 論

体外精子の生存延長に関する研究は、これまでに数限りなく行われてきている。この成功は生理学的にもまた人工授精への応用という実用的見地からもきわめて重要な意義を有する。

体外精子の生存を有利に導く条件として稀釈液の果す役割はきわめて大きい。PHILLIPS AND LARDY¹⁾によつて発見された卵黄緩衝液が牛精子の生存を著しく延長し、今日のごとき牛の人工授精の飛躍的進展の動因となつたことはあまりにも有名である。その後卵黄緩衝液は牛以外の家畜にも試みられ、馬(西川, 和出)²⁾や緬羊, 山羊(吉岡ら,^{3), 4)} BLOKUIS,⁵⁾ WAGNER,⁶⁾ SETINSKI et al.,⁷⁾などの精液稀釈にも有効に用いられることが報告されている。さらに西川ら⁸⁾は卵黄緩衝液に改良を加えたいわゆる山羊用セミンンの使用により、山羊精子がよく数日間の保存に耐えること、また山羊の個体によつてはこの稀釈液を用いてもなお保存後2, 3日ないし4, 5日にしてヨーグルト状に凝固し、これによつて全精子が死滅すること、またかかる卵黄緩衝液を凝固せしめる性質は山羊精液にのみみられる特異性であることを経験している。

このように卵黄緩衝液で稀釈した山羊精液が保存中に凝固するという事実は、これまでに知られていたが、凝固のメカニズムについてはほとんど知られておらず、これに関する文献としては、たまたまインドの ROY⁹⁾の報告をあげうるにすぎない。もしかかる稀釈液の保存中における凝固が山羊精液の場合にのみみられるものとすれば、このことは山羊の精液性状の特性として生理学的に興味ある問題であり、またかかる凝固を防止して精子の生存延長をはかることは、人工授精への応用の面からもきわめて必要なことと考えられる。著者はかかる凝固要因の本体ならびに凝固現象の実態を解明し、ひいては凝固防止の方法をも見出すことを目的に本研究に着手し、所期のいくつかの知見をえた。ここにこれらの実験成績を報告する。

第2章 山羊稀釈精液の凝固現象と山羊精液における特異性

第1節 緒 言

先述のごとく牛精液の稀釈液としてきわめて有効に用いられる卵黄緩衝液で山羊精液を稀釈すると保存後早いものでは2～3日で白濁し、ついでその翌日頃に凝固して全精子が死滅する。この実験はこれまでに経験されてきたこのような凝固現象の概要を知るために山羊精液に2, 3の処理を加えて凝固の有無をたしかめ、また山羊以外の家畜精液を卵黄緩衝液で稀釈して凝固の有無を再確認するために行われた。なお蛋白の種類を異にした他の稀釈液で山羊精液を稀釈し、卵黄のみが特異的に凝固するものか否かを検討した。

第2節 凝固現象の所見と山羊精液における特殊性

I 実験の材料および方法

1. 動物の種類と凝固の有無

供試精液はホルスタイン種牛8頭、和牛7頭、コリデール種緬羊6頭、ヨークシャー種豚13頭、兎5頭、ニューハンプシャー種鶏6羽、白色レグホーン種鶏7羽、およびザーネン種山羊¹⁰⁾14頭より採取したもので、鶏はBURROWS AND QUIN法変法による腹部マッサージ法で採取し、その他はいずれも人工陰法によつて採取した。精液は採取後直ちに卵黄と3%クエン酸ソーダ液を1:4の割合で混合した液（以下20%卵黄液と略記）で稀釈し、牛、緬羊、兎および山羊精液の場合は4°Cに、豚精液の場合は15°Cに、鶏精液の場合は10°Cにそれぞれ15～20日間保存し、保存中の凝固の有無や凝固に至る日数をしらべた。精液の稀釈倍率は牛では6～8倍、緬羊および山羊では10倍、豚、兎は3倍、鶏は5倍である。

2. 山羊精液中の凝固要因の所在

この実験は凝固要因が精子にあるか精漿にあるかを明らかにするために行われた。2頭の山羊から採取した精液に、採取直後等量のリンゲル液を加えてよく混合し、約600G10分間遠心分離してえた上澄液を精漿試料とし、この沈澱物にもとの精液量になるまでリンゲル液を加えてよく混合したものを1回洗滌精子試料、これを再び遠心分離し、その沈澱物に原精液量になるまでリンゲル液を加えて混合したものを2回洗滌精子試料とした。このほか精漿および精子をそれぞれ沸騰水中で5分間加熱したものを加熱精漿、加熱精子とした。また山羊精液と牛精液の間で精漿を交換した試料を調製した。すなわち、山羊の2回洗滌精子にあらかじめ分

離しておいた牛精漿を山羊の原精液量になるまで加えて混合したもの、牛の2回洗滌精子に山羊精漿を牛の原精液量になるまで加えて混合した精子浮遊液を調製した。これらの各試料に20%卵ク液を添加して10倍に稀釈し、4°Cに保管して凝固の有無や凝固に至る日数をしらべた。以上の2項目の実験は昭和34年9月から35年12月に至る間に行われた。

Ⅱ 実験成績ならびに考察

1. 動物の種類と凝固の有無

牛、緬羊、豚、兎、鶏および山羊精液を卵ク液で稀釈保存して凝固の有無をしらべた結果、第1表に示すように、山羊精液においてのみ凝固が起り、その他の家畜では全く凝固しなかった。また卵ク液で稀釈した馬精液の保存結果からもかかる凝固現象は報告されていない（西川¹¹⁾和出¹¹⁾）。

つぎに第1表中の14頭135例の山羊精液について凝固に至る日数をみると早いものでは保存後1~2日目に、遅いものでも7~8日目に凝固し、4~6日目に凝固する例が最も多かった。なおヨーグルト状に凝固する1~2日前にまず白濁現象がみられた。

第1表 卵黄緩衝液稀釈精液における凝固の有無

動物の種類	頭数	精液試料数	凝固の頻度	凝固の%
牛	15	60	0	0
緬羊	6	13	0	0
豚	13	112	0	0
兎	5	6	0	0
鶏	13	9	0	0
山羊	14	135	135	100

2. 精液中の凝固要因の所在部位

上記の実験から、卵黄含有稀釈液を凝固せしめる要因は、山羊精液だけにみられる特異現象であることが知られた。本実験ではかかる凝固の要因が、山羊の精子、精漿のうちのいずれに由来するかを検討しようとしたものであるが、その結果は第2表に示すように精液と生精漿に卵ク液を加えた場合にのみ凝固が起り、洗滌精子を加えても凝固は起らなかった。このことは凝固要因が精漿中にあつて精子に無関係であることを示すものである。なお煮沸精漿、煮沸洗滌精子の添加は凝固を伴わなかったが、これは精漿中に存在する凝固要因は高温によつて破壊されることを示すものである。なお凝固要因が山羊精漿中にあることを確かめるために、牛精

液と山羊精液の間でそれぞれ精漿を置換したのち、これを卵ク液で稀釈保存して凝固の有無をみたが第3表に示すように精子の種類とは無関係に山羊精漿を含む場合においてのみ凝固が起つた。

第2表 山羊精液中の凝固要因の所在

	山羊 No.	保 存 日 数						
		0日	2	4	6	8	10	12
生 精 液	1	-	±	+				
	2	-	-	±	+			
2 回 洗 滌 精 子	1	}	-	-	-	-	-	-
	2		-	-	-	-	-	-
加 熱 2 回 洗 滌 精 子	1	}	-	-	-	-	-	-
	2		-	-	-	-	-	-
精 漿	1	-	±	+				
	2	-	-	±	+			
加 熱 精 漿	1	}	-	-	-	-	-	-
	2		-	-	-	-	-	-

注： - 変化なし， ± 白濁， + 凝固

第3表 山羊と牛との間の精漿の交換と凝固の有無

動物の 種類	精 液 条 件	保 存 日 数						
		0日	2	4	6	8	10	15
山羊 No. 1	生精液	-	-	±	+			
	洗滌精子	-	-	-	-	-	-	-
	生精漿	-	-	±	+			
	洗滌精子+牛精漿	-	-	-	-	-	-	-
山羊 No. 2	生精液	-	-	-	±	+		
	洗滌精子	-	-	-	-	-	-	-
	生精漿	-	-	-	-	±	+	
	洗滌精子+牛精漿	-	-	-	-	-	-	-
牛	生精液	-	-	-	-	-	-	-
	洗滌精子	-	-	-	-	-	-	-
	生精漿	-	-	-	±	+		
	洗滌精子+山羊No. 1 精漿	-	-	-	-	±	+	

注： - 変化なし， ± 白濁， + 凝固

第3節 稀釈液の種類と凝固の有無

上記の実験から卵黄を含有する稀釈液で山羊精液を稀釈した場合、凝固現象の起ることが知られたが、この実験は稀釈液中に含まれる蛋白の種類をかえてみて、凝固が起るか否かを知るために行われた。

I. 実験の材料および方法

蛋白の給源としては鶏卵、乳、血清の3者を用いた。鶏卵はさらに全卵、卵黄、卵白の3者をそれぞれ20%の割合に3%クエン酸ソーダ液にとかしたもので、卵黄を20%の割合に溜水にとかしたもの（20%卵黄水）、卵白だけのもの、乳としては新鮮牛乳、新鮮山羊乳のほか、これを95°C5分間加熱したもの、血清は山羊から採血分離したものを生のまま、または60°C30分間の加熱により不働化したものを用いた。精液は3頭の山羊から人工鹽法により採取したものを用い、採取直後上記の稀釈液で10倍に稀釈して4°Cに15日間保存し、凝固の有無を観察した。

以上の実験は、昭和34年9月から35年12月に至る間に行われたものである。

II. 実験成績ならびに考察

実験の結果は第4表に示すように、卵白、牛乳、山羊乳、血清のいずれを山羊精液と混合しても凝固せず、卵黄を含む液の場合にのみ凝固した。

第4表 稀釈液の種類と凝固の有無

稀釈液の種類	稀釈液 pH	保 存 日 数							
		0	1	2	3	4	5	10	15
20%卵黄クエン酸ソーダ	7.1	-	-	-	±	+			
20%卵白クエン酸ソーダ	8.7	-	-	-	-	-	-	-	-
20%全卵クエン酸ソーダ	7.8	-	-	±	+				
20%卵黄水	6.2	-	+						
全卵白	9.0	-	-	-	-	-	-	-	-
全牛乳	6.9	}	-	-	-	-	-	-	-
加熱全牛乳	7.0		-	-	-	-	-	-	-
全山羊乳	7.0	}	-	-	-	-	-	-	-
加熱全山羊乳	7.1		-	-	-	-	-	-	-
山羊血清	7.3	}	-	-	-	-	-	-	-
山羊不働化血清	7.3		-	-	-	-	-	-	-

注： - 変化なし， ± 白濁， + 凝固

以上の結果は Roy⁹⁾ の牛乳，卵白で稀釈した場合には凝固が起らなかったという結論と一致しているが，全卵においても凝固しなかったとする結果とは一致しない。また第4表によると卵黄含有液のうち20%卵黄水で稀釈した場合に最も早く凝固し，全卵一ク液と卵ク液がこれについている。表示のように後2者のpHは7.8と7.1であつて卵黄水の6.2よりもかなり高い。後述のように凝固の起る最適pHは6.0附近にあることから考えて，卵黄水の場合はpHの好条件が他の2者に比べ凝固を促進したのではないと思われる。なお本実験では全卵ク液で稀釈するとかえつて卵ク液の場合より早く凝固したが，これは後述（第3章4節）のように卵黄濃度10%前後を頂点にして濃度が高まるにつれて白濁現象が抑制されることから考えて，全卵一ク液の卵黄濃度7%は卵ク液の20%よりも白濁に対して好条件にあるためと思われる。Roy⁹⁾ は全卵に精漿を加えても凝固しないと報告しているが，これは全卵そのものではpHが高く，またこの場合の卵黄濃度が約30%になり，このような凝固に不利な条件が，白濁や凝固を抑制したのではないかとと思われる。

第4節 摘 要

山羊精液中の卵黄凝固要因の所在ならびに2，3の凝固誘起の条件につき検討し，大要つぎのような結果がえられた。

1. 精液を卵黄緩衝液で稀釈して保存した場合，山羊精液でのみ凝固が起り，牛，綿羊，豚，兎，鶏などの精液では凝固が起らなかった。なお用いた山羊精液の全例において8日以内に凝固がみられたが，凝固作用の強さは，個体によりまた精液採取の都度かなりの変異がみとめられた。

2. 山羊精液中の凝固要因は精漿中に存在し，精子は凝固現象に関与しない。またこの要因は，煮沸によつてその機能を失つた。

3. 凝固現象は，卵黄を含む稀釈液に凝固要因物質（山羊精漿）を加えた場合にのみみられ，牛乳，山羊乳，山羊血清，卵白などと混合して保存しても凝固しなかった。

第3章 凝固要因の性質

第1節 緒言

前章の実験において山羊精液中の卵黄凝固要因は、煮沸によつてその機能を失うことから一応酵素様の物質ではないかと考えられた。本章の実験はこのことを確認するため、さらに温度、pH、卵黄濃度などの条件と凝固作用との関係を検討し、このことから凝固要因の性質を明らかにする目的で行われた。なおこの凝固要因が酵素とすればどのような種類に属するものかを判定する手がかりをもえようとした。手はじめにこの実験では温度、pH、卵黄濃度を種々にかえて凝固の強さ（以下凝固活性度と称す）との関係をしらべ、さらに凝固作用に及ぼす各種の塩類、金属イオンその他2、3の薬剤添加の影響についても検討した。

第2節 温度と凝固活性度

この実験には精漿（凝固要因）そのものに対する温度の影響と精漿と卵ク液を混合したいわゆる反応液に対する温度の影響の両者が含まれる。

1. 実験の材料および方法

1. 精漿の温度処理と凝固作用

精漿としては、山羊精液に等量のリンゲル液または等量の氷冷水を加えて遠沈した上澄液を用い、これを0.1 N NaOH-0.1 Nクエン酸ソーダ緩衝液でpHを6.0に調整した後50～65°Cに1～5分間処理したものを加熱精漿とした。対照としての非加熱の精漿はpHを6.0に調製して-5～-8°C凍結保存したものを融解し、0°C附近に保つたものを使用した。卵ク液は約1 N-HClでpHを6.0に調整した20%卵ク液を用いた。これら精漿および卵ク液のpHを6.0に調整したのは、本実験と相前後して行つたpHと凝固作用に関する実験で（後述）、凝固作用の最適pHが6.0附近にあることが知られたからである。

なお凝固の強さの判定には既述のように卵黄含有液で稀釈したものを4°Cに保管して、凝固に至る日数を基準にする方法もあるが、この方法では判定に長時間を要するので、本実験ではつぎの方法が採用された。

すなわち、上記のように処理した山羊精漿0.1 mlを卵ク液1 mlと混合しこれを40°Cの恒温槽中に9～24時間浸漬し（40°C採用の理由は後述の実験による）、混合液の濁度と脂肪酸量を後述の要領で測定して凝固の強さ（凝固活性度）とした。

2. 精漿と卵ク液との混合液の浸漬温度と凝固性

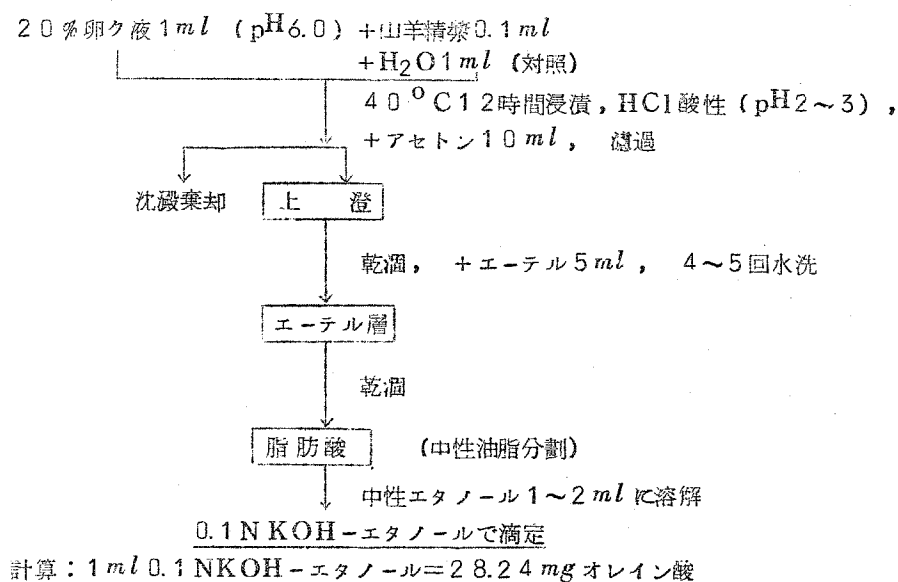
この実験は凝固作用に対する最適温度を知るために行われた。精漿 0.1 ml と卵ク液 1 ml の混合液を $4^{\circ}\sim 50^{\circ}\text{C}$ の7段階の恒温槽中に3~24時間浸漬し、混合液の濁度と脂肪酸量を測定した。

本実験において凝固作用の強さを測定する方法として濁度と脂肪酸量の測定を採用した主な理由とその方法につきのべる。

既述のように凝固の起る前に液が白濁するが、白濁と凝固とは本質的に同じ性質のものであり、白濁現象の程度のすすんだ状態が凝固現象と考えられた。そこで凝固の強さを濁度で示そうとした。濁度の測定は Beckman 分光光度計を使用し、波長 $500\text{ m}\mu$ で比濁した。白濁液そのままでは濁度が強すぎるので、この液 0.1 ml に 4 ml の3%クエン酸ソーダ液を加えて希釈し、蒸留水に対する吸光度を測定し、その100倍値を濁度とした。この際希釈液として3%クエン酸ソーダを使用したのは、凝固作用とは無関係な酸による可逆的な白濁を除去するためであり、測定波長を $500\text{ m}\mu$ にしたのは $300\sim 700\text{ m}\mu$ のうちで $500\text{ m}\mu$ において最大の吸光度を示したからである。

つぎの脂肪酸量の測定の目的は第8章でのべることく凝固の際に脂肪酸の増加することが知られたので、この実験では脂肪酸量の測定値を濁度の測定値と併行して凝固の強度測定の指標とした。脂肪酸の定量は VAN DE KAMER¹²⁾ の方法に準じて下記のようにして行つた。

第5表 脂肪酸量の測定法

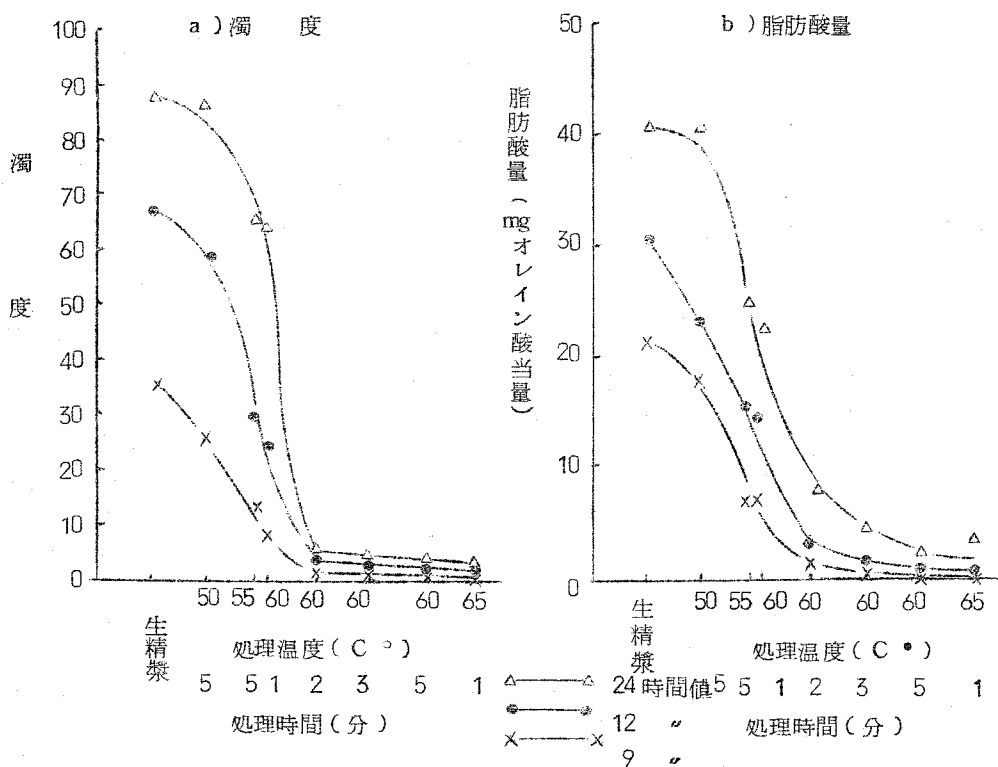


なお脂肪酸量はすべてオレイン酸当量で示した。また 浸漬条件を主として12時間、40⁰Cとしたのは後述のように40⁰Cは凝固作用にとつて最適温度であり、12時間後でも凝固作用の速度がほとんど低下しないことによるものである。

Ⅱ 実験成績ならびに考察

1. 精漿に対する各種の温度処理と凝固性

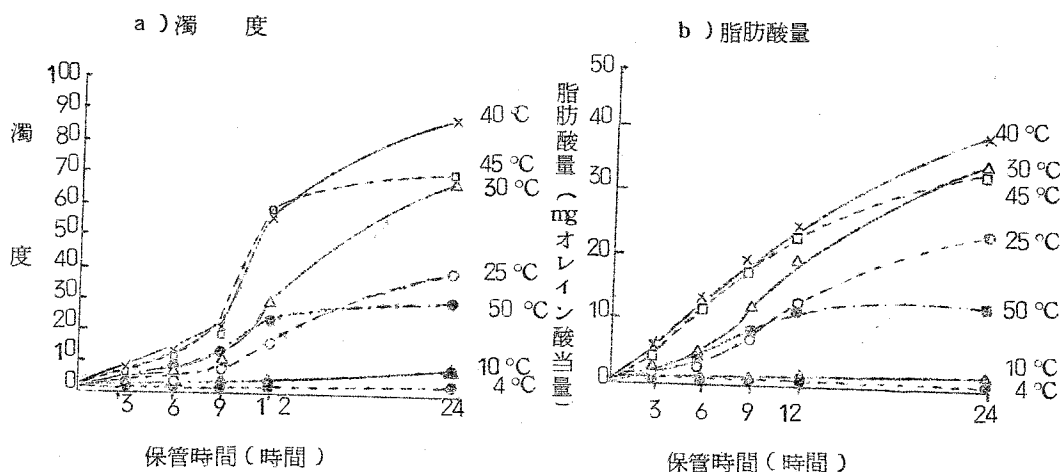
第2章で煮沸精漿は凝固を誘起しないことが知られたが、これはおそらく高温によつて、精漿中の凝固要因の機能が破壊されたことを意味するものと考えられる。本実験は、はたしてどの程度の熱処理によつて凝固性が失われるか、その限界を知るために行われた。その結果第1図に示すように濁度と脂肪酸量の値はほとんどの類似の傾向を示し、50⁰C5分の処理ですでにかなりの凝固機能が失われ、55⁰C5分と60⁰C1分の処理では、さらにその影響が強く、60⁰C2～5分の処理でほとんど完全にその機能を失うことが知られた。なお60⁰C1分以下の温度処理の場合、9時間値よりも12時間値が、また24時間値がそれよりもさらに高い値を示しているが、これは40⁰Cの条件下で時間の経過につれて残存した凝固要因の機能が凝固をすすめたものと思われる。



第1図 精漿の熱処理と凝固活性度

2. 精漿と卵ク液との混合液の保管温度と凝固性

この実験は精漿と卵ク液を混合したものを $4 \sim 50^{\circ}\text{C}$ の恒温槽中に $3 \sim 24$ 時間作用せしめ、これらの温度条件と凝固作用との関係を知り、ひいては凝固の最適温を知らんとして行われた。実験成績は第2図に示すように、濁度と脂肪酸の値の傾向は全く同じく、温度が上昇するにつれて凝固度も高くなり、 40°C を頂点にして最高の値を示すことが知られた。 40°C を越すとかえって凝固性が低下し、 40°C と 45°C を比較すると12時間値までは、ほと



第2図 反応液の保管温度と凝固活性度

んど差がないが、24時間値では明らかに 40°C の方が高かった。 50°C の区は3～6時間値ですでに 40°C の区よりもはるかに凝固度が低いことが、これは上述の高温処理の実験で、卵黄を加えない精漿そのものを、 50°C にわずかに5分間浸漬するだけですでに凝固能力が低下した事実と一致する。

3. 凝固作用の時間的経過

凝固作用の速度は、濁度によつて示した場合と脂肪酸量によつて示した場合とではかなり傾向が異なる(第2図a), b)。前者では浸漬後9時間程度までは凝固の速度は遅く、その後9時間から12時間に至る間に曲線が急激に上昇しているが、これはある種の酵素反応にみられる誘導期の現象に類似するものと考えられ、^{13), 14), 15)}このことは凝固要因が一定の温度以上で破壊されることと併せ考察して、この要因は一種の酵素ではないかと考えられる。後者の脂肪酸量によつて凝固性を示した場合には上述のような傾向はほとんどみとめられなかつた。

以上の実験結果から凝固要因はかなり低温度の熱処理によつて容易にその機能を失い、 45

0°C程度でも長時間保存すると凝固能力が低下する。従つて凝固度の測定に當つて、温度の條件が実験結果に著しく影響することが容易に知られるが、測定の際の温度を40°C前後にとることが必要と思われる。またこの際の40°Cの條件におく時間は、上記の1)の実験から12時間または24時間値をとり、この場合いずれを採用したかを明記する必要がある。なお、45°C、24時間保存は、凝固作用に有害なこと、12時間値では凝固作用の速度がほとんど低下しないことなどを考え合わせて、12時間値を採用するのが望ましいと思われる。

第3節 pHと凝固活性度

凝固現象がpHによつてどのように影響されるか、また凝固のための最適pHはどの附近にあるかを確かめるためにこの実験を行つた。

I 実験材料および方法

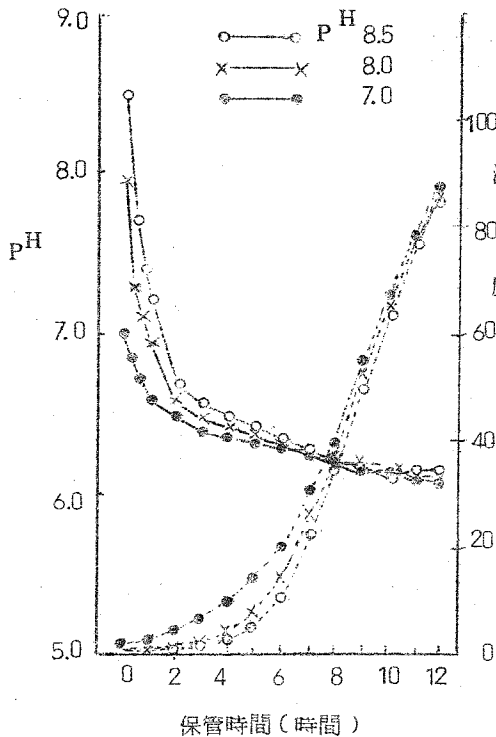
この実験の予備試験では20%卵黄液のpHを1N-HClと1N-NaOHで5.5~9.0の範囲に調整し、精漿0.1mlに各pHの卵黄液を1mlの割合に加えて40°Cに12時間おき濁度を測定してpHと凝固度との關係を検討し、ついで混合液の内容を精漿0.1mlに対し1N-HClと1N-NaOHでpHを3.0~8.0の9段階に調整した3%卵黄液(3%クエン酸ソーダに3%の濃度になるように卵黄を添加)5mlを加え、これを40°Cに24時間浸漬し、上記の方法で凝固度を測定した。

II 実験成績ならびに考察

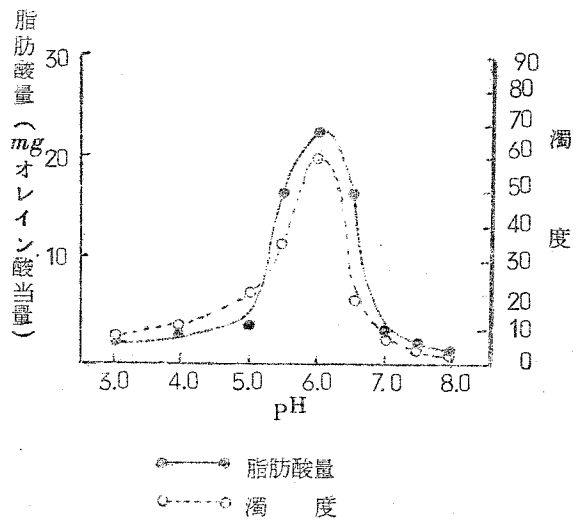
予備試験では第3図に示すように濁度の測定と同時にpHを経時的に測定してみたところ中性およびアルカリ側の溶液のpHがきわめて短時間内に6.5附近に下降することが認められた。すなわちこの凝固要因は、この程度の高い卵黄濃度と精漿濃度では白濁の初期にpHを低下させるような性質を有するためではないかと思われ、このような条件下では至適pHの確認の不可能なことがわかつた。そこで方法の項で既述したように混合液中の卵黄濃度と精漿濃度を十分低くして、凝固作用とpHとの關係を追究した。両者の濃度を薄くした場合には、混合液のpHは40°C12時間保存後も変化はなく、3.0~8.0に維持されていた。その結果第4図に示すように、凝固作用に対する最適pH値は大体6.0附近にあることがわかつた。

以上に得られた結果から凝固要因物質を含有する液をつねにpH6.0附近に保つことは勿論であるが、凝固活性度測定の際の卵黄含有液も予めpHを6.0に調整しておくのが望ましい。しかしこの凝固要因の場合、上述のように短時間内に混合液のpHを低下させる性質があるので、20%卵黄液(pH7.0)をそのまま測定に使用しても12時間値で凝固度を比較する際

には大した影響はないものと思われる。



第3図 混合液の保管中の pH の変化と濁度の変化



第4図 pH と凝固活性度の関係

第4節 卵黄濃度と凝固活性度

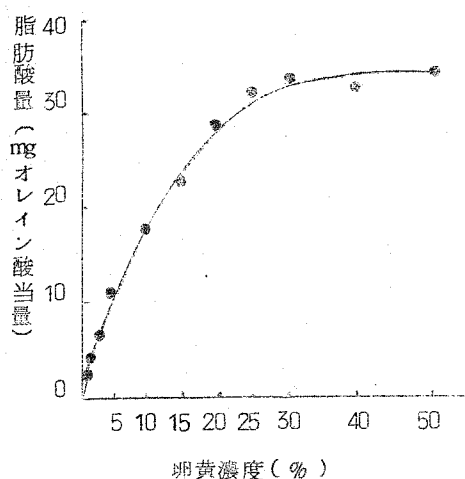
この実験は卵ク液中の卵黄濃度を種々に変えて、その濃度と凝固作用との関係を検討するために行われた。

I 実験の材料および方法

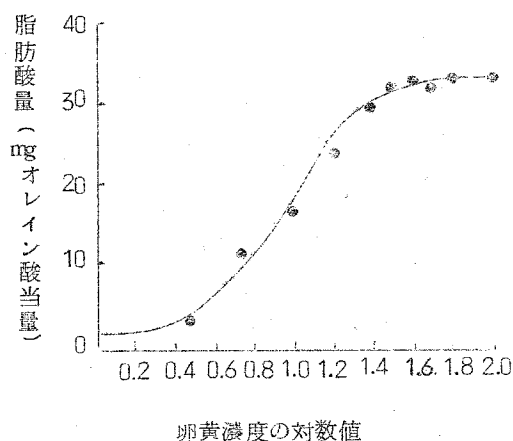
混合液の内容は精漿 0.2 ml に各濃度の卵ク液を 2 ml の割合に加えたもので、凝固活性度の測定は前節同様に行つた。各濃度の卵ク液は精漿を加えた最終濃度で 0.5% ～ 5.0% の9段階になるように、まず 3.3 、 4.4 、 5.5% の卵ク液を作り、これを 3% クエン酸ソーダ液で 0.55% ～ 5.5% になるように希釈調製し、 1 N-HCl を用いて各濃度の卵ク液の pH を 6.0 に調製した。

II 実験成績ならびに考察

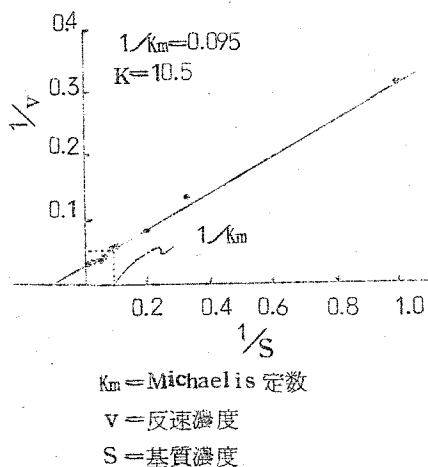
実験結果は第5図に示すように脂肪酸値で示した凝固活性度は卵黄濃度20%前後までは急激に高まり、それ以上の濃度では飽和値に達し、第6図に示すように凝固活性度と卵黄濃度(対数値)との関係はS字型曲線を示した。これらの結果から一応凝固活性度を反応速度にとり、かりに卵黄濃度を基質濃度として、MICHAELIS の式¹⁶⁾を応用して各卵黄濃度と対応する凝固活性度から、飽和値の半速をあたえる卵黄濃度を計算してみると、9.6%になった。これを第7図に示すような、LINEWEAVER-BURK 図解法を応用してもとめた半速卵黄



第5図 凝固活性度に及ぼす卵黄濃度の影響
(脂肪酸値の場合)

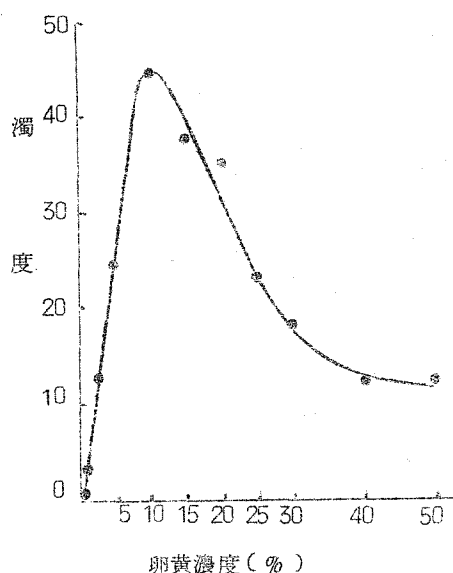


第6図 卵黄濃度(対数値)と凝固
活性度との関係



第7図 凝固作用に対するLineweaver -
Burk 図解法の適用

濃度10.5%と比較すると大略一致し、これによつて脂肪酸値で示した凝固活性度は卵黄濃度20%程度で飽和値に達することが知られた。この際の卵黄濃度は(%)で示されたものであつて、MICHAELIS の式に示される基質のモル濃度(S)ではなく、半速卵黄濃度はMICHAELIS の定数ではない。



第8図 凝固度に及ぼす卵黄濃度の影響 (濁度の場合)

ーゼでみとめられている。^{18), 19)}

以上の結果から脂肪酸量で凝固度を示す場合には、卵黄濃度20%附近で飽和値を示すことが本実験で知られたが、このことから凝固活性度の測定には、この濃度のものを使用すればよいと思われる。濁度で凝固活性度を示す場合には、濃度10%附近に最大値があるので、濃度10%を採用するのが望ましい。しかし20%卵黄液を使用しても後述のように精漿濃度と濁度との間に狭い範囲ではあるが直線的関係がみられるので、同一の実験シリーズで凝固活性度の比較値を対象とする場合には、さしつかえないものと思われる。

第5節 凝固要因 (酵素) の濃度と凝固度

この実験は、精漿中および尿道球腺抽出液中 (後述のごとく凝固要因は尿道球腺に由来する) の凝固要因物質の濃度と凝固度との間にいかなる関係があるかを調べるために行われた。

I 実験の材料および方法

混合液の内容は、各濃度の精漿0.5 ml に25%卵黄液 (pH6.0) 2 ml を加えたものである。前者の場合、精漿の添加量が大きいののでとくに25%卵黄液を使用し、混合液中の卵黄濃度が20%になるようにした。凝固度の測定は第2節同様に行つた。また尿道球腺抽出液の

MICHAELIS の式:

$$K_M = \frac{S}{v} (V_{\max} - v)$$

K_M = MICHAELIS 定数

v = 反応速度

S = 基質濃度

V_{\max} = 飽和最大反応速度

つぎに濁度によつて凝固作用と卵黄濃度との関係を検討したが第8図に示すように、上述の脂肪酸値の場合と傾向が異なり、卵黄濃度10%で頂点に達し、それより高濃度側ではかえつて凝固度は低下した。なおこれに類する現象がある種のコリンエステラ

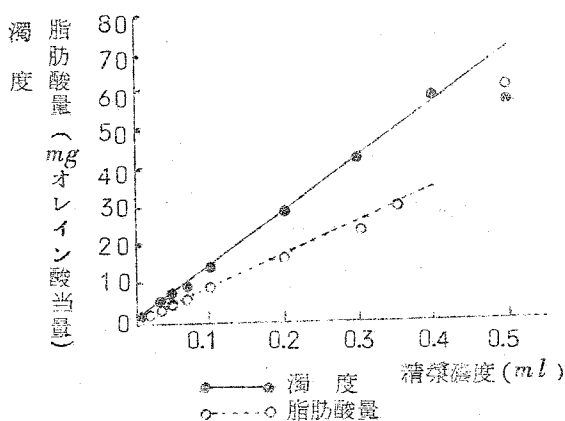
場合は凝固作用が強いので浸漬時間を3時間に短縮した。また各濃度の精漿は0.5 ml の氷冷水中に0.01~0.5 ml の精漿を含有せしめたものであり、各濃度の尿道球腺抽出液は、尿道球腺に等量の溜水を加えて抽出した液をさらに17,000 G 60分間超遠沈し、その上澄液0.005~0.1 ml を0.1 ml 氷冷水中に含有せしめたものである。

II 実験成績ならびに考察

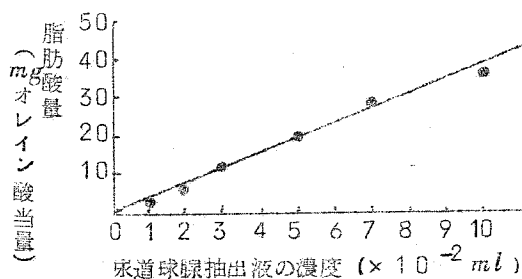
凝固要因として精漿を用いた場合の結果を示すと第9図のとおりである。濁度によつて濃度との関係を示した場合には、濁度30% (混合液内容: 精漿0.35 ml + 25% 卵ク液2 ml) 程度までは兩者の間に直線関係がえられるが、それ以上の濃度では濁度は急激に上昇した。また脂肪酸量によつて濃度との関係を示すと、脂肪酸量60 mg (混合液内容: 精漿0.4 ml + 25% 卵ク液2 ml) 程度までは

兩者間に直線関係がみられた。つぎに凝固要因物質として尿道球腺抽

出液を使用した場合の濃度と凝固度との関係を示せば第10図のとおりである。なお方法の項で既述したように、この場合に浸漬時間を3時間に短縮したのは、この抽出液中の凝固要因の濃度が精漿中におけるよりもはるかに高く、速かに白濁凝固するからである。第10図によれば尿道球腺抽出液でも、上述の精漿の場合と同様に濃度と脂肪酸で示した凝



第9図 凝固度に及ぼす精漿濃度の影響



第10図 凝固度と尿道球腺抽出液の濃度

固度との間に直線関係がえられた。

以上の結果から精漿濃度はむしろ精漿中に含まれる凝固要因の濃度として考えるべきで、たとえ精漿量が少くともそれに含まれる凝固要因の量が極端に高ければ、精漿濃度と凝固度との間に直線関係がえられな

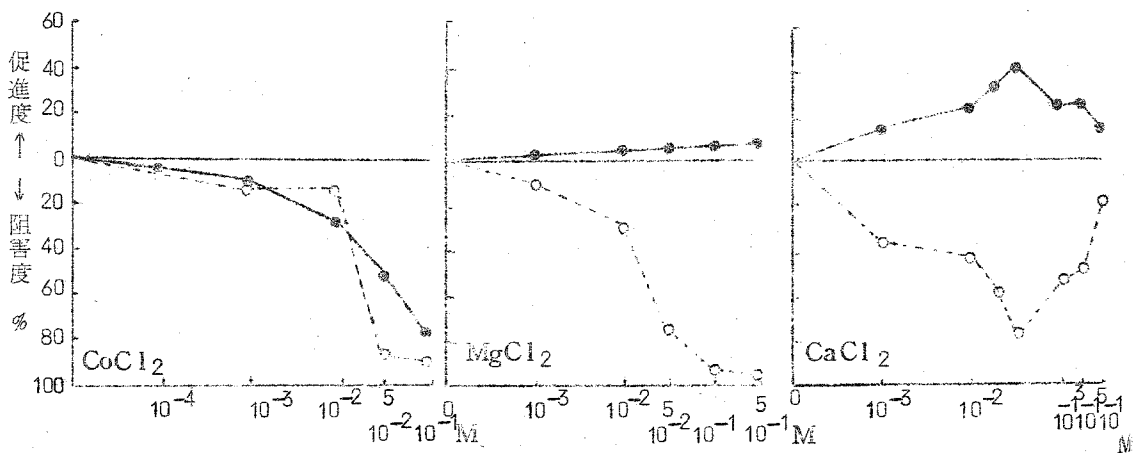
くなり、このような場合には両者の間に比例関係のえられるような濃度にて精漿を稀釈してから、凝固度を測定すべきであると思われる。

第6節 各種塩類、金属イオン、その他2, 3の薬剤添加が凝固活性度におよぼす影響

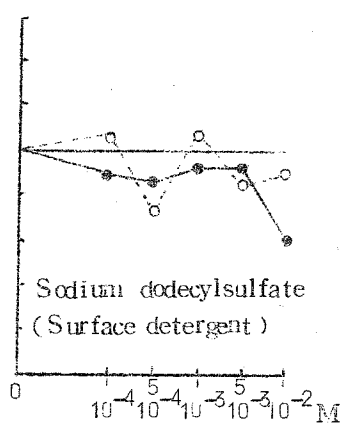
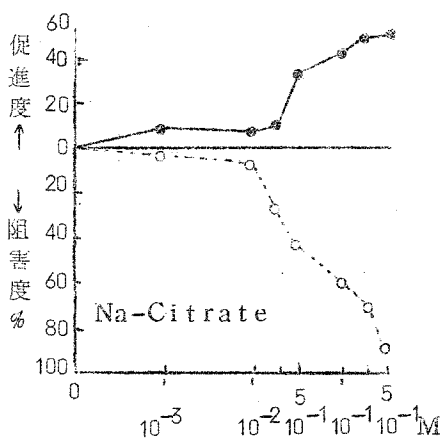
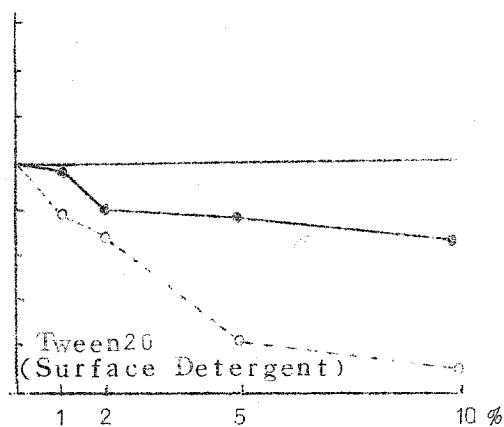
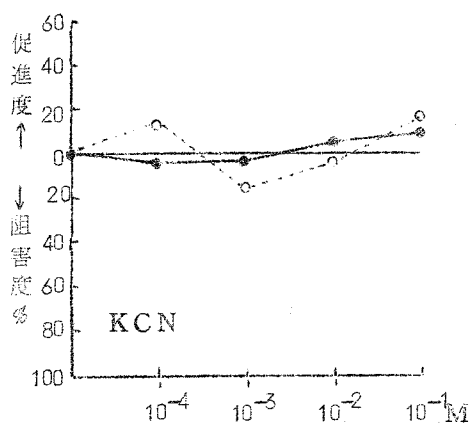
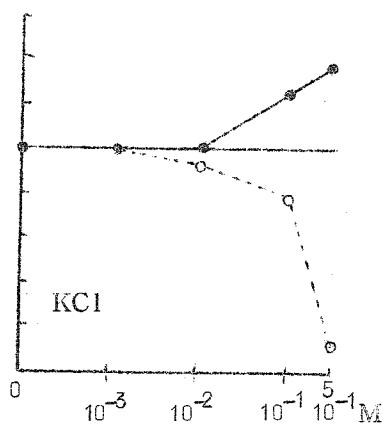
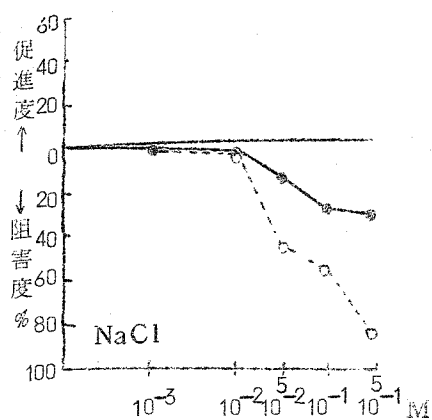
一般に酵素に対する阻害剤、促進剤の影響を明らかにすることは、その酵素の性質を明らかにする意味で重要であると同時に、その酵素に関する応用的研究を行う上にもきわめて大切なことと思われる。上述のようにこの卵黄凝固要因は種々の性質が明らかになるにつれて、ほぼ酵素であることが推定されたが、本実験では手はじめに、塩類、金属イオン、その他2, 3の薬剤添加がこの酵素の作用に及ぼす影響を検討した。

1 実験の材料および方法

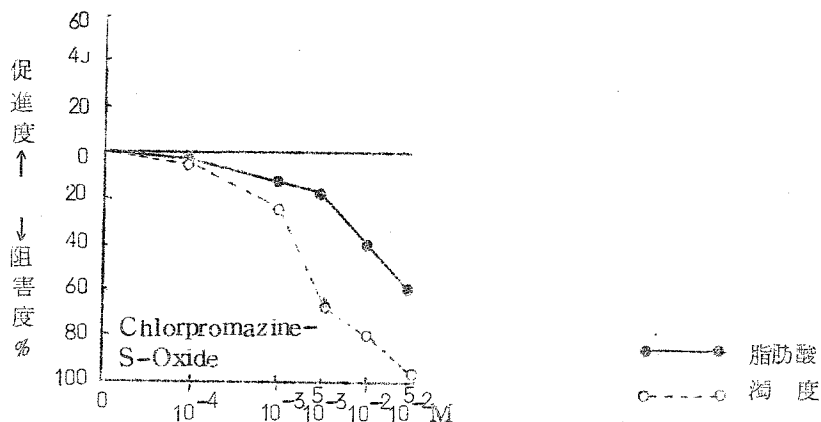
供試された金属イオンは Ca, Co, Mg であつていずれも塩化物を用い、Na と K も塩化物を、また青酸イオンとしては KCN を用いた。またクエン酸ソーダも用いられた。界面活性剤として Tween 20, Sodium dodecylsulfate を、このほか Chlorpromazine-S-oxide (トランキライザーの一種) を供試した。これらのものはいずれも第11図および第6表に示されるような濃度になるように20%卵黄水中に添加し、pH を6.0に調整して、このもの1mlに凝固要因としての精漿(粗酵素液) 0.1mlを加えて40°Cに12時間浸漬し、第2節にのべた方法に準じて濁度と脂肪酸量で測定し、凝固作用の阻害、促進の有無をしらべた。なお KCN は pH の調整によつて CN がガス化して揮散するので反応液の pH を調整すると同時に密栓して供試した。



(第11図)



(第11圖)



第11図 凝固作用に及ぼす塩類ならびに薬剤添加の影響

II 成績ならびに考察

各種濃度の塩類ならびに薬剤を加えた場合の濁度と脂肪酸量を一括して示すと第6表ならびに第11図の通りである。なお第6表中には、無添加の対照区とくらべ、促進度(+)と阻害度(-)が併記された。最初に脂肪酸法による結果につき、つぎの6種の塩類を添加した場合の影響をのべる。

CoCl_2 : 10^{-2}M で29.9%, 10^{-1}M で80.2%阻害。

MgCl_2 : あまり影響がない。

CaCl_2 : 10^{-2}M で24.6%, $5 \times 10^{-2}\text{M}$ で42.8%, 10^{-1}M では25.4%促進。

NaCl : 10^{-1}M で29.6%阻害。

KCl : 10^{-1}M で25.3%促進。

KCN : あまり影響がない。

以上のように Co はかなり強い阻害剤であり, Mg や CN はほとんど影響はなく, Ca はかなり凝固作用を促進した。 K は高濃度になるとわずかに促進の傾向がみられた。なお Phospholipase-A のある種のものでは, Ca イオンにより賦活されること,^{20), 21)} KCN は阻害作用をもたないことなどが知られている。²²⁾ これらのことから本実験における凝固酵素は Phospholipase-A に類することが想像される。しかし高濃度の Ca^{++} や Mg^{++} は Phospholipase-A に対し抑制的に働くことも報告されているので,²³⁾ この結果だけで

第6表 各種塩類，金属イオンならびに2，3の薬剤添加が凝固活性度に及ぼす影響

試薬 の種類	試薬の 濃度(M)	凝固活性度		阻害(-) 促進(+)		試薬 の種類	試薬 の濃 度(M)	凝固活性度		阻害(-) 促進(+)	
		脂肪酸 (mg)	濁度 (%)	脂肪 酸法	濁度法			脂肪酸 (mg)	濁度 (%)	脂肪 酸法	濁度法
CoCl ₂	0	18.1	46.4	0	0	KCN	0	11.1	17.5	0	0
	10 ⁻⁴	17.4	44.4	-4.0	-4.3		10 ⁻⁴	10.8	20.2	-2.3	+15.4
	10 ⁻³	16.2	39.3	-10.2	-14.4		10 ⁻³	10.8	14.7	-2.9	-16.0
	10 ⁻²	12.7	39.7	-29.9	-15.3		10 ⁻²	11.3	16.9	+1.9	-3.4
	5×10 ⁻²	8.7	4.8	-52.1	-89.7		10 ⁻¹	12.2	20.2	+10.2	+15.4
	10 ⁻¹	3.6	3.6	-80.2	-92.3						
MgCl ₂	0	20.1	71.6	0	0	Tween 20	0	29.1	78.1	0	0
	10 ⁻³	19.9	66.4	-0.8	-7.3		1	30.2	60.5	+3.7	-22.5
	10 ⁻²	20.9	50.7	+4.0	-29.2		2	23.1	51.5	-20.7	-34.1
	5×10 ⁻²	20.9	17.9	+4.0	-75.0		5	22.1	14.1	-24.3	-81.9
	10 ⁻¹	21.1	5.2	+5.0	-92.7		10	18.5	5.7	-36.5	-92.7
	5×10 ⁻¹	21.6	1.6	+7.0	-97.8	Sodium citrate	0	16.5	87.5	0	0
CaCl ₂	0	9.4	38.8	0	0		10 ⁻³	17.9	85.7	+8.6	-2.0
	10 ⁻³	11.0	25.8	+16.9	-33.5		10 ⁻²	17.5	84.4	+6.4	-3.5
	10 ⁻²	11.8	22.9	+24.6	-41.0		5×10 ⁻²	18.2	62.0	+10.2	-28.9
	5×10 ⁻²	13.5	8.5	+42.8	-85.8		5×10 ⁻¹	22.0	49.7	+33.4	-43.2
	10 ⁻¹	11.8	17.9	+25.4	-53.9		10 ⁻¹	23.5	36.0	+42.8	-58.8
	5×10 ⁻¹	10.8	32.0	+14.3	-17.5		5×10 ⁻¹	24.6	24.2	+49.2	-72.3
NaCl	0	14.6	72.6	0	0	Sodium dodecyl- sulfate	0	14.4	93.6	0	0
	10 ⁻³	14.4	72.5	-1.4	-0.1		10 ⁻⁴	13.1	101.2	-9.4	+8.1
	10 ⁻²	14.2	71.4	-2.9	-1.7		5×10 ⁻⁴	12.8	66.7	-11.5	-28.6
	5×10 ⁻²	12.2	39.5	-16.6	-45.6		10 ⁻³	13.5	101.9	-6.0	+9.2
	10 ⁻¹	10.3	30.2	-29.6	-58.4		5×10 ⁻³	13.4	82.5	-6.8	-11.9
	5×10 ⁻¹	9.9	8.2	-32.3	-88.7		10 ⁻²	9.0	87.5	-37.5	-6.5
KCl	0	10.9	114.9	0	0	Chlorpromazine- hydroxide	0	17.9	36.4	0	0
	10 ⁻³	9.9	107.4	-9.3	-6.5		10 ⁻⁴	17.5	35.5	-2.6	-2.5
	10 ⁻²	10.2	114.0	-6.9	-0.8		10 ⁻³	15.8	28.0	-11.9	-23.1
	10 ⁻¹	14.9	92.1	+25.3	-19.9		5×10 ⁻³	14.7	11.5	-18.1	-68.4
	5×10 ⁻¹	13.7	12.1	+36.3	-89.4		10 ⁻²	10.7	7.3	-40.2	-80.0
							5×10 ⁻²	7.2	0.9	-60.1	-97.5

酵素の種類を規定することは早計である。つぎに濁度によつて凝固度を測定した結果は第11図および第6表に示されるように Co, Ca, Na, K, Mg などはいずれも白濁, 凝固を抑制しているが, この白濁は本酵素の本質的な作用による脂肪酸の遊離なる現象に随伴して起る物理的現象と考えられ(後述第9章), したがつて濁度の数値のみで阻害と促進の関係を論ずることは, 当をえていないと考えられ, 添加剤の凝固度に及ぼす影響は, 脂肪酸量による数値をもつて論ずるのが妥当ではないかと思われる。したがつて以下の添加剤については, 脂肪酸量をもつて論ずる。

界面活性剤: 界面活性剤はいずれもかなりの阻害作用をもつようであり, Tween 20は2%で2.07%, 10%では36.5%阻害し, Sodium dodecylsulfate は $10^{-2}M$ で37.5%, $10^{-4}M$ でもわずかながら阻害作用がみられた。

クエン酸ソーダ: クエン酸ソーダは $5 \times 10^{-2}M$ 程度になると33.4%促進し, 低濃度でもわずかながら促進の傾向がみられた。Roy⁹⁾ は卵黄クエン酸ソーダの方が卵黄水溶液より凝固し難いと報告しているが, このことは, 本実験結果と一致しない。ただし Roy⁹⁾ の報告結果は凝固度を脂肪酸量で示したものでなく, 白濁, 凝固の程度を肉眼的に比較した結果である。

Chlorpromazine-S-oxide: これはすでに西川, 和出ら⁸⁾ により精子に対する代謝抑制の目的で牛や山羊用の精液稀釈剤に有効に使用され, また 山羊用稀釈液中にふくまれる Chlorpromazine-S-oxide が山羊の稀釈精液の保存中の凝固作用をかなり抑制することが知られていた。この実験では各種の濃度の添加と凝固阻害度との関係をみたが, $10^{-3}M$ ですでに11.9%, $5 \times 10^{-2}M$ では60.1%, 同濃度で濁度法によると阻害度は97.5%にも達し外観上はほぼ完全に阻害していた。なおこれまでも BERNSHON et al.,^{24) 25)} 楊河によつて Chlorpromazine のようなフェノチアジン系の薬剤が酵素作用を抑制することが報告されている。

第7節 摘 要

山羊精漿中の卵黄凝固要因について, 凝固の強さと温度, pH, 卵黄濃度との関係および凝固要因物質の濃度と凝固の強さとの関係を調べ, また2, 3の無機塩類や薬剤の添加が凝固作用に及ぼす影響を調べた。

1. 精漿(凝固要因)自体を $50^{\circ}C$ 5分間処理することにより, その凝固作用はかなり損われ, $50^{\circ}C$ 2~5分の処理でほとんど失われた。凝固作用に対する最適温度は $40^{\circ}C$

前後であつた。また凝固作用の速度は 40°C に保存後 12 時間程度までほとんど低下しなかつた。

2. 凝固作用に対する最適 pH は大体 6.0 であつた。

3. 脂肪酸量で示された凝固度は、卵黄濃度 20% 程度で飽和値に達し、濁度で示された凝固度は卵黄濃度 10% で最大値を示し、それ以上の高濃度ではかえつて濁度は低下した。

4. 精漿中および尿道球腺抽出液中にある凝固要因の濃度と凝固度との間には、凝固要因の限られた濃度の範囲内では直線的関係が認められた。

5. Co, Chlorpromazine-S-oxide, Tween 20 などはかなり強力な凝固阻害作用があり、Na も高濃度ではわずかに阻害するようである。界面活性化剤の一つ Sodium dodecylsulfate や KCN, MgCl_2 などは凝固作用にほとんど影響を与えず、 CaCl_2 は中濃度で促進作用があり、クエン酸ソーダや KCl は高濃度でやや促進するようである。

以上のえられた結果から凝固要因の諸性質がかなり明らかにされ、それと同時に凝固要因物質が多く の点で酵素の性質を有することが認められた。

第4章 凝固現象の強度と関連ある2, 3の条件

第1節 緒言

凝固酵素の活性度に影響を及ぼす要因はきわめて多いと考えられるが、この実験では主として精液の採取条件によつて活性度がどのように変るかを検討するために次の4項目がとり上げられた。すなわち 1) 採取回次, 2) 採取季節, 3) 枯渇採取(短時間内連続採取), 4) 電気刺激採取などであるが、このように採取条件と酵素活性度との関係をしらべることは、凝固酵素の本体や性質を究明する上に大切なことであり、また山羊の人工授精の実施上にも資するものと考えられる。なお第5章にのべるごとく凝固酵素が尿道球腺分泌液に由来することが知られているので、この実験では精液成分のうち主として精のうから分泌され则认为られている果糖、クエン酸、蛋白なども同時に定量し、これらと酵素活性度との関連性を比較して尿道球腺と精のうの分泌機能につき何らかの知見がえられはしないかと考えて行われた。

第2節 山羊の個体、採取季節、採取回次による酵素活性度の変異

I 実験の材料および方法

供試山羊は健康なザーネン種成山羊3頭であつて実験開始時の年令はNo.1, No.2 は13ヵ月令, No.3 は10ヵ月令であつた。実験は1960年4月から2カ年にわたり、各個体毎に毎月2回その都度連続3回人工膣法によつて精液を採取した。なお実験用の精液採取の前3日間は採取を休止した。採取精液は直ちに氷冷下で2,000G15分間遠心分離して精子を除き、精漿について果糖は ROE 法²⁶⁾、クエン酸は NATELSON 法²⁷⁾、蛋白は銅-FOLIN 法²⁸⁾によつて定量した。また酵素活性度は同一精漿試料について第3章第2節におけると同様な方法で測定した。

II 実験成績ならびに考察

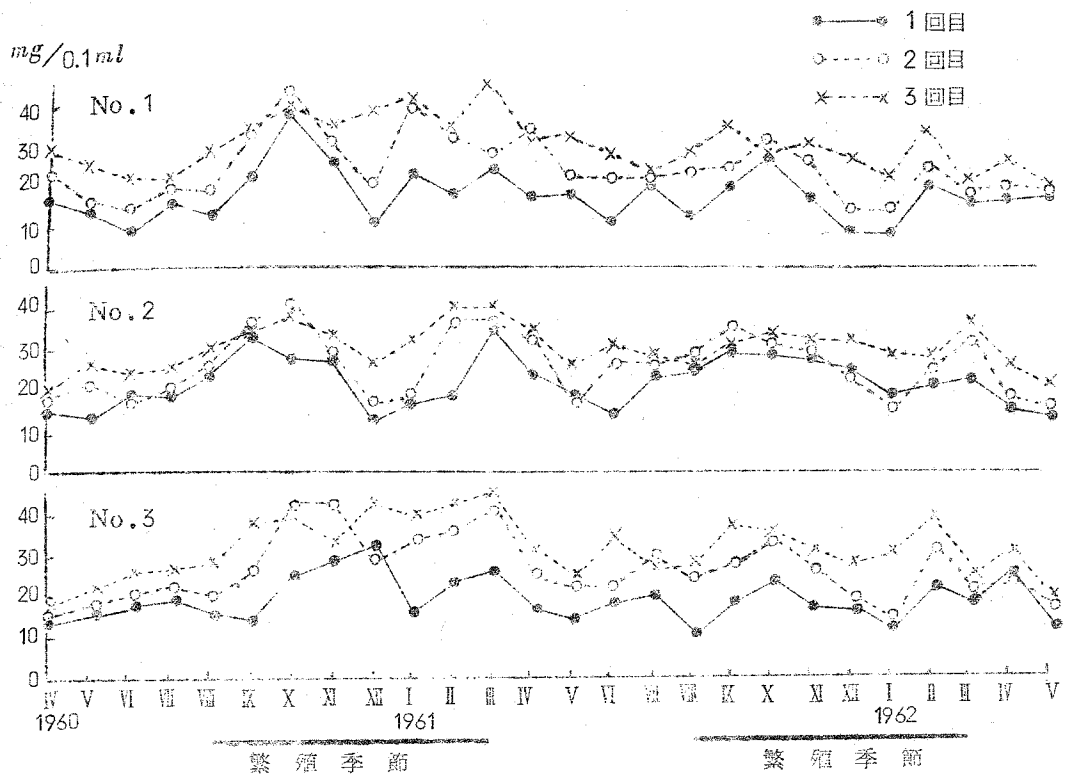
1. 酵素活性度

第12図には、個体別、採取回次別に毎月2回採取した精液についての脂肪酸量の測定値をそれぞれ平均して、その月の活性度として示し、また個体別、採取回次別、季節別の脂肪酸量の平均値を一括して第7表に示した。

a) 個体変異

3頭の山羊について採取回次とか季節にかかわらず、それぞれ100~116例について総

平均値をもとめてみるとNo.1 は $24.7 \text{ mg}/0.1 \text{ ml}$, No.2 は $26.6 \text{ mg}/0.1 \text{ ml}$, No.3 は $28.1 \text{ mg}/0.1 \text{ ml}$ 精漿となり, 個体間に大差はみられないようである。しかし図示のごとく, 採取月毎にみると個体によつてかなり大きな変異がみとめられるようである。



第12図 凝固酵素活性度 (脂肪酸量: mg オレイン酸当量/ 0.1 ml 精漿)

第7表 凝固酵素活性度 (脂肪酸量) の個体, 季節, 採取回次による変異

山羊 No.	採 取 季 節	採 取 回 次		
		1 回 目	2 回 目	3 回 目
1	B	23.5 ± 14.6	28.8 ± 10.9	34.2 ± 8.9
	N-B	14.4 ± 3.7	20.4 ± 7.4	26.6 ± 6.4
2	B	24.2 ± 8.6	30.1 ± 10.3	33.7 ± 7.9
	N-B	19.8 ± 7.0	24.0 ± 7.4	27.1 ± 4.2
3	B	24.3 ± 15.5	32.5 ± 9.5	37.6 ± 9.1
	N-B	17.0 ± 3.9	22.8 ± 5.6	28.7 ± 2.3
計		20.5 ± 1.0	26.9 ± 10.1	32.0 ± 8.5

注: B: 繁殖季節, N-B: 非繁殖季節

b) 採取季節による変異

第12図に示すように季節的な変異はかなり判然としており、全体的にみて7～8月から10月にかけて活性度は上昇し、10月以降2月ないし3月まで月によって多少の増減があるが、ほぼ最上位の値を示し、その後下降して5月～7月はほぼ最低一定値を示し、ついで7～8月から再び上昇することく観察される。8月から翌年3月に至る間を繁殖季節とし、それ以外の月を非繁殖季節として全体の平均値で示すと前者は $29.9\text{ mg}/0.1\text{ ml}$ 、後者は $22.5\text{ mg}/0.1\text{ ml}$ であつた。いま活性度について個体別に繁殖季節と非繁殖季節にわけて、それぞれ平均値の差の有意性を検討してみると第8表に示すごとくになり、いずれの個体についても繁殖季節の方が非繁殖季節よりも有意に活性度の高いことが推定された。

第8表 酵素活性度 および果糖、クエン酸、蛋白濃度などの季節による差の有意性の検定

	山羊 No.	自由度	t 値	有意性
酵素活性度	1	118	4.394	**
	2	113	3.366	**
	3	100	3.638	**
果 糖	1	115	6.148	**
	2	103	13.640	**
	3	100	15.200	**
クエン酸	1	115	2.917	**
	2	113	16.056	**
	3	100	10.398	**
蛋 白	1	115	8.998	**
	2	113	12.800	**
	3	100	14.436	**

c) 採取回次による変異

これまでも精液を連続採取した際に第1回目の射精液を稀釈保存しても凝固し難いことが屢々経験されてきたが、この一連の実験から第12図に示すごとく、2、3の例を除いてほとんどの場合に1回目、2回目、3回目と採取回次のすすむにつれて活性度の上昇する傾向がみられ、しかもこれは年間を通じてみとめられた。このことは第7表に総括した採取回次別の平均値からもうかがうことであり、3頭の山羊についての平均値でそれぞれ 20.5 ± 11.0 、 26.9 ± 10.1 、 $32.0 \pm 8.5\text{ mg}/0.1\text{ ml}$ 精漿であつた。なお各個体について季節別に採取

回次による活性度の差の有意性を検定した結果第9表に示すごとなり，1回目と2回目の差は6例中2例で有意でなかつたが，1回目と3回目について比較してみるとすべての場合にきわめて高い有意差がみとめられた。また第12図によると2回目よりも3回目の活性度の方が全般に高いようであるが，この両者間には有意差のみとめられない場合もかなりあつた。しかし個体や季節にかかわらず採取回次別に一括した全体の平均値の差について統計処理を行つたところ，1回目と2回目，2回目と3回目，1回目と3回目のいずれの組合せでも表示のように高い有意差が認められた。

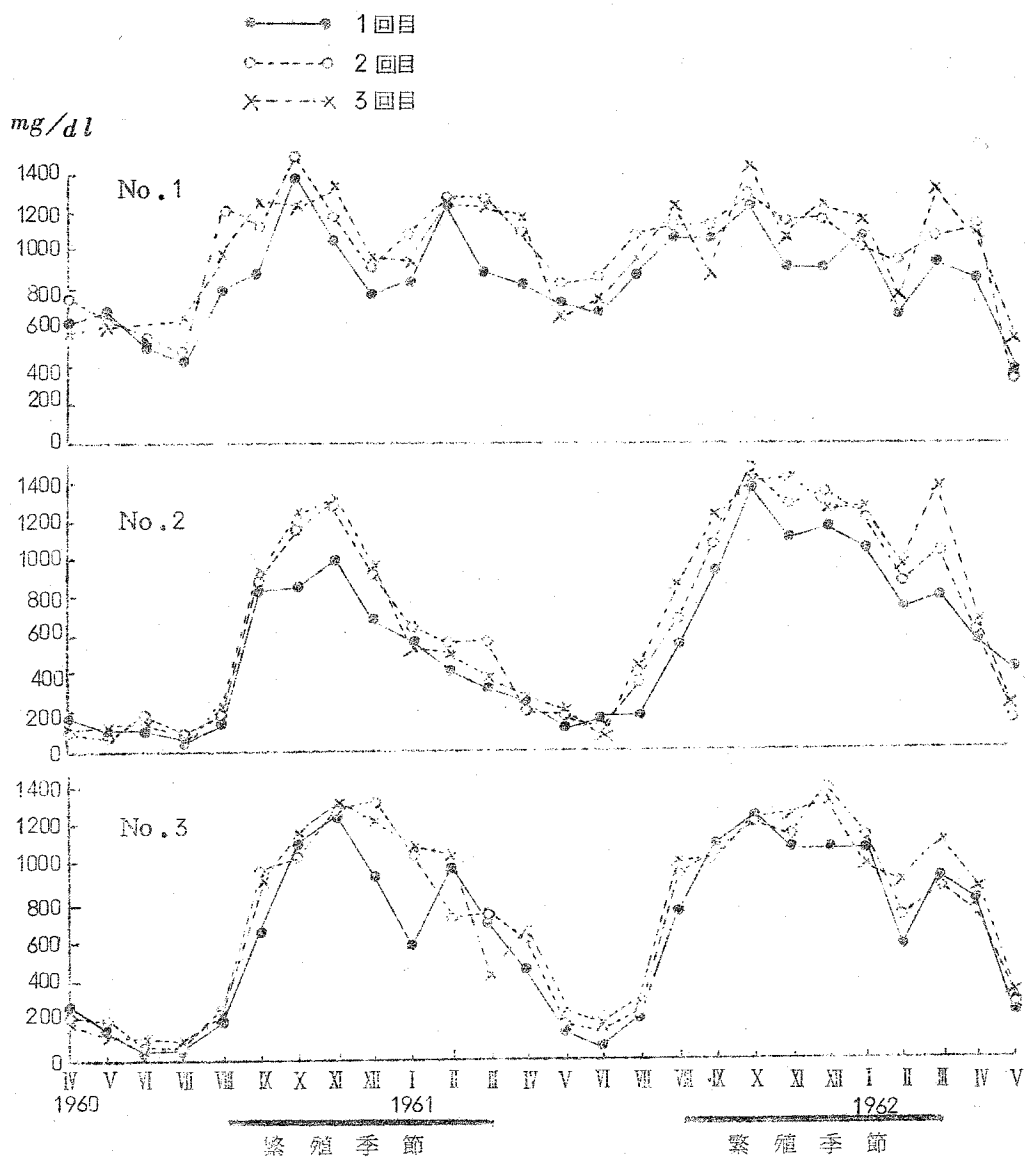
第9表 酵素活性度の採取回次（Ⅰ，Ⅱ，Ⅲ）による差の有意性の検定

山羊 No.	採取季節	検定の組合せ	自由度	t 値	有意性
1	繁殖季節	Ⅰ－Ⅱ	38	1.470	なし
		Ⅰ－Ⅲ		2.873	**
		Ⅱ－Ⅲ		1.580	なし
	非繁殖季節	Ⅰ－Ⅱ	36	3.186	**
		Ⅰ－Ⅲ		7.700	**
		Ⅱ－Ⅲ		3.125	**
2	繁殖季節	Ⅰ－Ⅱ	42	2.119	*
		Ⅰ－Ⅲ		4.000	**
		Ⅱ－Ⅲ		1.448	なし
	非繁殖季節	Ⅰ－Ⅱ	32	1.403	なし
		Ⅰ－Ⅲ	30	3.537	**
		Ⅱ－Ⅲ	30	1.516	なし
3	繁殖季節	Ⅰ－Ⅱ	41	2.204	*
		Ⅰ－Ⅲ	41	3.483	**
		Ⅱ－Ⅲ	40	1.700	なし
	非繁殖季節	Ⅰ－Ⅱ	24	3.188	**
		Ⅰ－Ⅲ	23	9.563	**
		Ⅱ－Ⅲ	22	3.643	**
計		Ⅰ－Ⅱ	223	4.245	**
		Ⅰ－Ⅲ	220	8.250	**
		Ⅱ－Ⅲ	218	3.777	**

2. 果糖，クエン酸および蛋白の濃度

a) 個体ならびに採取季節による変異

第13，14-a，b図に示されるようにこれら3成分の濃度は繁殖季節の方が非繁殖季節よ



第13図 果糖量 (mg/dl 精漿)

りも明らかに高く、果糖ではそれぞれ 1039.1 mg/dl 、 304.8 mg/dl 、クエン酸ではそれぞれ 460.9 mg/dl 、 27.60 mg/dl 、蛋白ではそれぞれ 6.1 mg/0.1ml 、 2.9 mg/0.1 ml であつた。これらの季節による差異について統計的処理を行つてみたところ第8表に示すごとくいずれも高い有意性がみとめられた。また第13, 14-a, b 図に示されるように、これら3成分の濃度は個体によつて年間変異の様相に差があり、山羊No.1では他の2頭に比して年間を通じてあまり著しい変動は示さず、この個体では一般に季節変異の著しい果糖についてさえも変動は少なかつた。なお年間を通じて果糖濃度の高い山羊No.1では、他の2頭に比してクエン酸や蛋白の濃度も高く、No.3, No.2の順に濃度は低いようであつた。これに反して酵素活性度はNo.1が最も低かつた。

第10表 精漿中の果糖、クエン酸および蛋白濃度の個体、季節、採取回次による変異

	山羊 No.	採取 季節	採 取 回 次					
			1 回 目		2 回 目		3 回 目	
果 糖 mg/dl	1	B	1034.0 ± 257.6		1187.7 ± 151.4		1165.8 ± 264.6	
		N-B	718.2 ± 226.4		858.3 ± 298.4		815.4 ± 260.8	
	2	B	814.6 ± 319.6		1000.9 ± 301.6		1021.1 ± 348.8	
		N-B	164.5 ± 108.1		198.9 ± 149.4		199.8 ± 205.0	
	3	B	965.0 ± 274.5		1065.0 ± 258.0		1098.5 ± 287.3	
		N-B	196.6 ± 177.6		233.9 ± 205.8		239.5 ± 213.1	
ク エ ン 酸 mg/dl	1	B	444.8 ± 99.1		489.5 ± 102.9		472.2 ± 95.3	
		N-B	397.4 ± 116.4		482.2 ± 142.8		389.6 ± 96.8	
	2	B	347.2 ± 124.3		545.8 ± 163.8		413.0 ± 119.3	
		N-B	149.7 ± 49.8		153.6 ± 56.7		132.8 ± 45.1	
	3	B	466.4 ± 111.6		456.1 ± 100.7		418.5 ± 140.6	
		N-B	212.8 ± 88.1		226.1 ± 104.2		230.5 ± 117.2	
蛋 白 mg/0.1 ml	1	B	6.3 ± 1.4		6.7 ± 1.6		6.4 ± 1.5	
		N-B	4.1 ± 1.3		4.2 ± 1.7		4.0 ± 1.1	
	2	B	5.2 ± 1.4		5.5 ± 1.6		5.4 ± 1.9	
		N-B	2.4 ± 0.8		2.2 ± 0.7		2.0 ± 0.6	
	3	B	6.3 ± 1.8		6.7 ± 1.5		6.8 ± 1.8	
		N-B	2.7 ± 1.0		2.4 ± 0.9		2.1 ± 0.5	

注：B：繁殖季節，N-B：非繁殖季節

b) 採取回次による変異

第10表および第13, 14-a, b 図によると, これら3成分の濃度はいずれも酵素活性度の場合と異り, 採取回次による変異に一定の傾向はみとめられなかつた。ただ果糖のみはクエン酸や蛋白とやや異り, 図および表に示されるように2回目, 3回目の方が1回目よりも幾分高い傾向がうかがわれた。しかしこれは酵素活性度にみられたような顕著な差ではなく, 統計処理の結果からも有意差はみられなかつた。LUKUTKE et al.²⁹⁾ は山羊において2回目の射出精液の果糖濃度は1回目のものよりも有意に高いことを報告しているが, 精液中の濃度として示された場合には採取回次のすすむにつれて精子濃度の低下することも考慮に入れて論ずるべきものと思われる。筆者の測定値は精漿についてのみ測定したものである。なおMANN³⁰⁾は牛精液についてではあるが採取回次別に果糖濃度を測定し, 1回目, 2回目, 3回目はそれぞれ760, 790, 900 mg/dl 精液であつて, 採取回次によつて大きな変化はみられなかつたと報告している。

上述のように尿道球腺分泌液に由来すると考えられる凝固酵素の活性度と主として精のうから分泌される果糖, クエン酸, 蛋白濃度との間に季節ならびに採取回次による変異の機相にかなりの差がみられることは興味ある問題と思われる。山羊の副生殖腺機能がアンドロゼンの季節的消長にともなつて年間変異を示すことは従来の多くの研究報告³¹⁾³²⁾³³⁾や第5章にのべる結果からも推定された。精のうの機能については精液中の果糖やクエン酸の量から, また人の前立腺の機能については酸性フォスファターゼ^{34), 35)}などから推定されることが知られてきたが尿道球腺の機能の推定をする指標については筆者の知る限りにおいては知られていない。本研究の結果, 第12図に示すごとく酵素活性度は果糖の場合のように判然としたものではないが, 統計処理の結果からも一応季節的に有意な増減がみとめられるので, これをもつて山羊に関する限りある程度尿道球腺機能の指標となりうるものと思われる。また先述のごとく凝固酵素活性度は採取回次によつてかなり大きな変動を示すので, その個体の酵素活性度を知るためには2~3回の連続採取精液について活性度を測定することが望ましい。さらに酵素活性度が採取回次のすすむにつれて上昇する傾向があるが, このことは精のう分泌液にみられる傾向と異るところであり, 連続射精させた場合の両者の副生殖腺の分泌機構が異なることを示唆するものとして興味ある結果と思われる。

第3節 精液の枯渇採取と精液中の酵素活性度

この実験では短時間内に精液を連続採取し, 採取回次によつて精液中の酵素活性度がど

のように変わるかをしらべた。なお本実験は前節でのべたように3回連続採取した多くの実験例で、採取回次のすすむにつれて酵素活性度の上昇することが知られているので、この上昇限度の有無をも明らかにしようとして行われた。なお酵素活性度と同時に精液の一般性状ならびに2, 3の化学的組成の変化もあわせて検討した。本実験の場合連続採取の回数は7~8回であり、この程度の回数では完全な枯渇状態に達したとは思われないが、約1時間内に7~8回連続採取すると乗駕欲が極端に低下し、それ以上の採取は不可能であつたので便宜上枯渇採取という言葉を用いた。

I 実験の材料および方法

実験にはザーネン種山羊2頭を使用し、精液採取は1962年の繁殖季節中すなわち11月~12月に行い、連続採取の前4~5日間は精液採取を休止した。精液採取に際しては台雌、台雄をとりかえ、できる限り前刺激を強くして50~70分間に7~8回の連続採取を完了するようにした。採取精液はその都度精液量を記録し、精子濃度算定用の試料採取後直ちに氷冷水中に浸し、また採取時間が長くなるので酵素活性度や化学的成分の変動をさけるために、連続採取の途中で2回逐次遠心分離して精子と精漿を分け、精漿試料は氷室に保存した。酵素活性度ならびに果糖²⁶⁾、クエン酸²⁷⁾、蛋白濃度²⁸⁾の測定は前節と同様の方法で行つた。

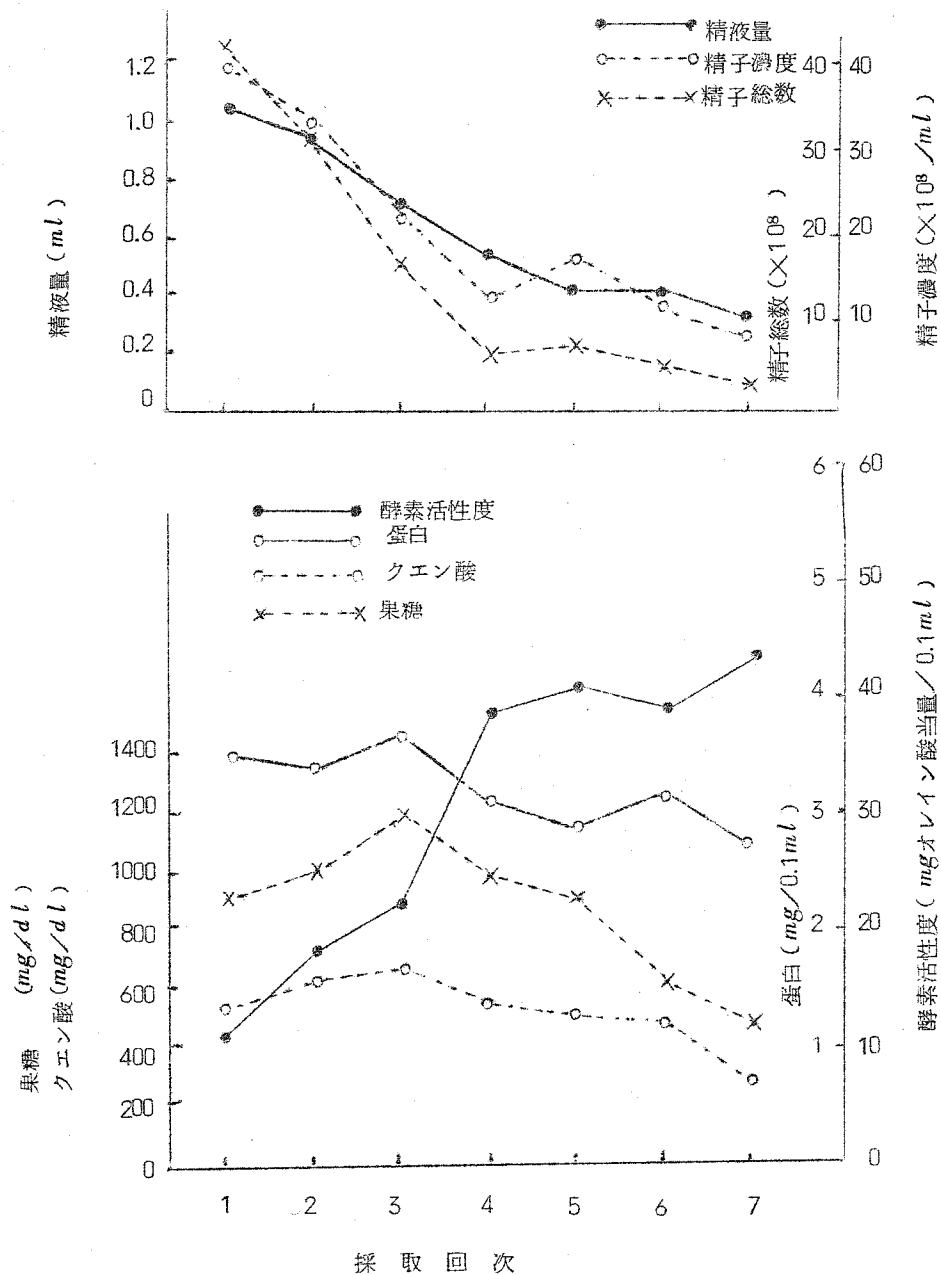
II 成績ならびに考察

山羊No. 1およびNo. 3についてそれぞれ3回の実験成績の平均値をもとめ第15図a), b)に示した。

1. 山羊No. 1の例: 酵素活性度は1, 2, 3回と採取回次のすすむにつれて上昇し、さらに4回目になると急激に増加し、第1回目の活性度の約4倍の $40\text{ mg} / 0.1\text{ ml}$ 精漿前後になつてほぼ定値を示し、以後7回目まで低下せずむしろ幾分上昇する。これに反して精液量と精子濃度は採取回次のすすむにつれて低下し、とくに精子濃度は4回目まで急激に低下し、その後7回目まで徐々に低下して約 $9.03 \times 10^8 / \text{ml}$ になつた。また果糖、クエン酸、蛋白などの濃度はいずれも1, 2, 3回目までほとんど低下しないが、幾分上昇しその後逐次に減少して7回目には果糖、クエン酸は1回目の約 $1/2$ 程度になつた。

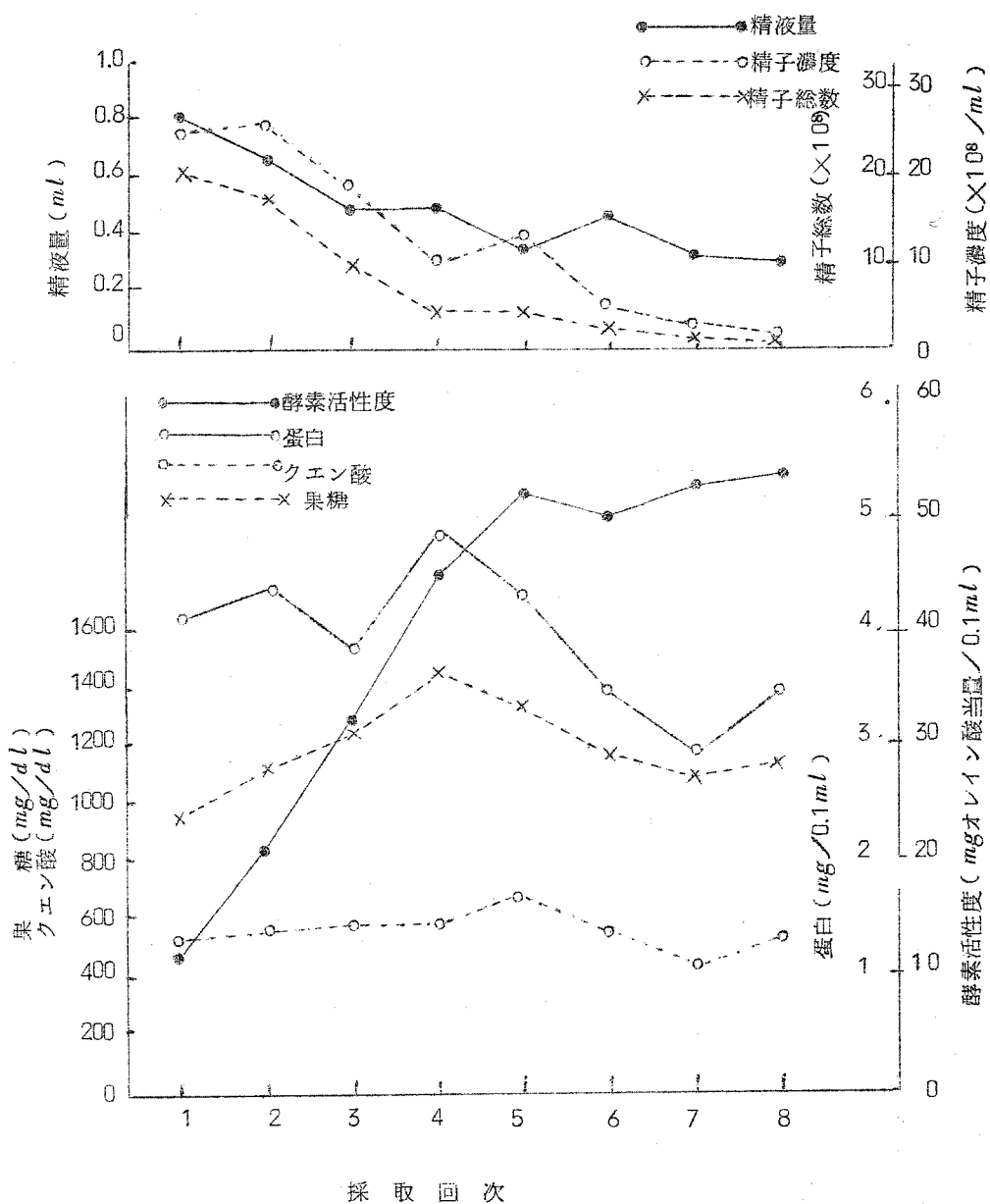
2. 山羊No. 3の例: 酵素活性度は5回目までほぼ直線的に上昇し、第1回目の活性度の約5倍程度になつて以後8回目までほぼ定値を示した。これに対し精液量、精子濃度も回次のすすむに従ひ低下した。また果糖と蛋白は4回目まで上昇し、その後7回目まで徐々に低下した。クエン酸は終始大きな変化はみられなかつた。

以上のことから精液量、精子濃度はいずれも採取回次のすすむに従つて低下し、また精のう



第15図 精液の枯渇採取が一般性状ならびに酵素活性度におよぼす影響

a) 山羊No.1の例



(第15図)

b) 山羊No.3の例

分泌物の成分と考えられる果糖，クエン酸および蛋白は山羊№3ではあまり低下しなかったが山羊№1では8回目には初回のほぼ半数になった。これらに反してひとり酵素活性度のみは，いずれの個体においても4～5回まで急激に上昇し，その後7～8回目まではほぼ一定となつて，低下するときことはなかった。このことから精のうと尿道球腺では採精回数によりその分泌様相がかなり異なることが推察された。

第4節 電気刺激による採取精液の酵素活性度

1 実験の材料および方法

1) 実験動物ならびに期間： 実験は3頭の健康なザーネン種山羊を使用して1961年9月～10月の繁殖季節中に行われた。

2) 精液採取法： 電気射精はプループ法により山羊を台上に横臥させて保定し（第16図），第11表に示される通電方法により行われた。また電気射精を行う5日前に人工膣法による精液を採取し，電気射精液についての成績と比較された。

3) 一般性状の検査ならびに化学的分析法： 射出精液は直ちに精液量，pH，精子活力を記録し，精子濃度算定のための試料採取後，氷冷水中に貯溜し，できるだけ速かに遠心分離して精漿試料を採取した。²⁶⁾ 精漿について酵素活性度，果糖，²⁷⁾ クエン酸，²⁸⁾ 蛋白などを第2節同様の方法で測定した。また乳酸はBARKER-SUMMERSON法³⁶⁾によつて測定した。濾紙電気泳動は小林の方法³⁷⁾に準じて行つた。

II 成績ならびに考察

1. 凝固酵素活性度，一般性状ならびに2，3の化学的組成の比較実験は電気射精（5～6回の分割）と人工膣法による採取（3回連続採取）を行つて，これを1実験とし，3頭各3例計9回の実験を行つた



第16図 電気射精法

第11表 電気刺激採取精液中の凝固酵素活性度ならびに2, 3の精液性状 (9例中の1例)

実験 月日	分割 No.	刺 戟 条 件		精液 量 (ml)	pH (B.T.B.)	精子 生存 指数	精子 濃度 ($\times 10^8$ /ml)	a. 蛋白 (mg/0.1 精液)	酵素活性度 b.		果 糖 クエン酸 乳糖 (mg/dl 精液)	乳 酸
		Volt	Amp. On Off (sec) (sec)						/0.1ml 精液	/mg 蛋白		
1961 ・ 10 ・ 2	1	1	0.01 5 40	0.3	8.6	—	0	0.55	29.14	52.98	1220	848
	2	3	0.02 5 40	0.3	8.6	—	7.36	1.30	33.97	26.13	2037.1	35.16
	3	5	0.05 5 30	0.3	8.6	—	3.96	1.07	39.32	36.89	5430	2620
	4	7	0.15 5 50	0.6	8.4	—	1.28	0.88	36.42	41.48	2936	22.84
	5	5	0.06 10	0.9	8.0	80	28.80	2.00	42.31	21.22	455.28	57.01
平均		—		0.38	8.55	—	3.15	0.95	34.71	36.54	7489	23.17
1961 ・ 10 ・ 7	1	人 工 膿		1.0	6.4	80	25.28	6.27	32.68	5.21	972.58	43.22
	2	(3回連続採取)		0.8	6.5	75	22.24	7.79	27.72	3.56	1277.81	26.75
	3	—		0.4	6.4	75	14.40	6.15	29.29	4.77	1227.06	28.81
	平均	—		0.73	6.43	77	20.64	6.74	29.90	4.43	1159.15	32.93

註: a. mgアルブミン当量, b. mgオレイン酸当量, c. 精子をほとんど含まぬ分割についての平均値

が、いずれもほぼ類似の結果がえられたので、その1例を第11表に示した。

第11表には各分画ごとの射出液中の酵素活性度を示したが、まず精漿0.1 ml 当りの活性度では電気射精液（以下E.S.とする）の方が人工腔法精液（以下A.V.とする）よりも全般に高く、全体の平均値で36.0 mg, 29.9 mg/0.1 ml であつた。つぎに精漿中の蛋白1 mg 当りの活性度すなわち比活性度で比較してみるとE.S.の方がA.V.の約8倍程度も高かつた。このことから電気刺激（低電圧）で精子を含みぬ射出液分劃を集めることによつて酵素純度の高い射出液のえられることが知られたが、これはおそらく精子を含みぬ分劃では、精のう由来の蛋白濃度の高い分泌液の混入程度が少いことによるものと思われる。このことは精のうに由来すると考えられている果糖、クエン酸、蛋白などの濃度ば、いずれもE.S.の方がA.V.に比べ低いことから裏付けされる。すなわち蛋白、果糖およびクエン酸の濃度のE.S.の平均値はそれぞれ0.95 mg/0.1 ml, 74.89 mg/dl, 135.2 mg/dl であつて、これに対しA.V.の平均値はそれぞれ6.74 mg/0.1 ml, 1159.15 mg/dl, 6323.5 mg/dl であつた。

なお、E.S.のこれら3成分の濃度は各分劃の精子濃度に平行していた。すなわち精子濃度は分劃5, 2, 3, 4, 1の順に高く、果糖、クエン酸および蛋白濃度もこの順に高かつた。このことはこれら3成分は精子の射出される場合に分泌され、精子を含みぬ分劃はpHが高くまた前述のごとく酵素活性度の高いことから主として尿道球腺分泌液からなることが推定された。

なお試料調製中に果糖が精子によつて分解され、正確な糖濃度を示さないことが予想されたので、解糖の有無を検査することを主たる目的として乳酸濃度を測定した。その結果測定された乳酸の濃度から考えてE.S.およびA.V.精液のいずれの場合にも糖濃度に影響を及ぼすほどの解糖が行われていないことが推定された。

2. 以上の成績は山羊No 1の1例につき示したものであるが、3頭9例につきE.S.のうち精子を含まないか、ごく少数含む分劃の全平均値をもとめ、これをA.V.の全平均値と比較のため一括して第12表に示した。これによるとE.S.はA.V.に比して1射精当りの精液量は少く、pHは高く、また蛋白は約1/3、果糖は約1/8、クエン酸は約1/3であつた。LUTWAK-MANN et al.³⁸⁾ も牛についてではあるが、これらと全く同様な傾向をみとめている。凝固酵素の比活性度は6~7倍も高かつた。なお上記のすべての項目ごとにE.S.とA.V.の両者の差について統計的処理を行つてみたところ、いずれの項目についてもきわめて高い有意性がみとめられた。

第12表 電気射精液ならびに人工臍採取精液における酵素活性度と2, 3の精液性状の比較

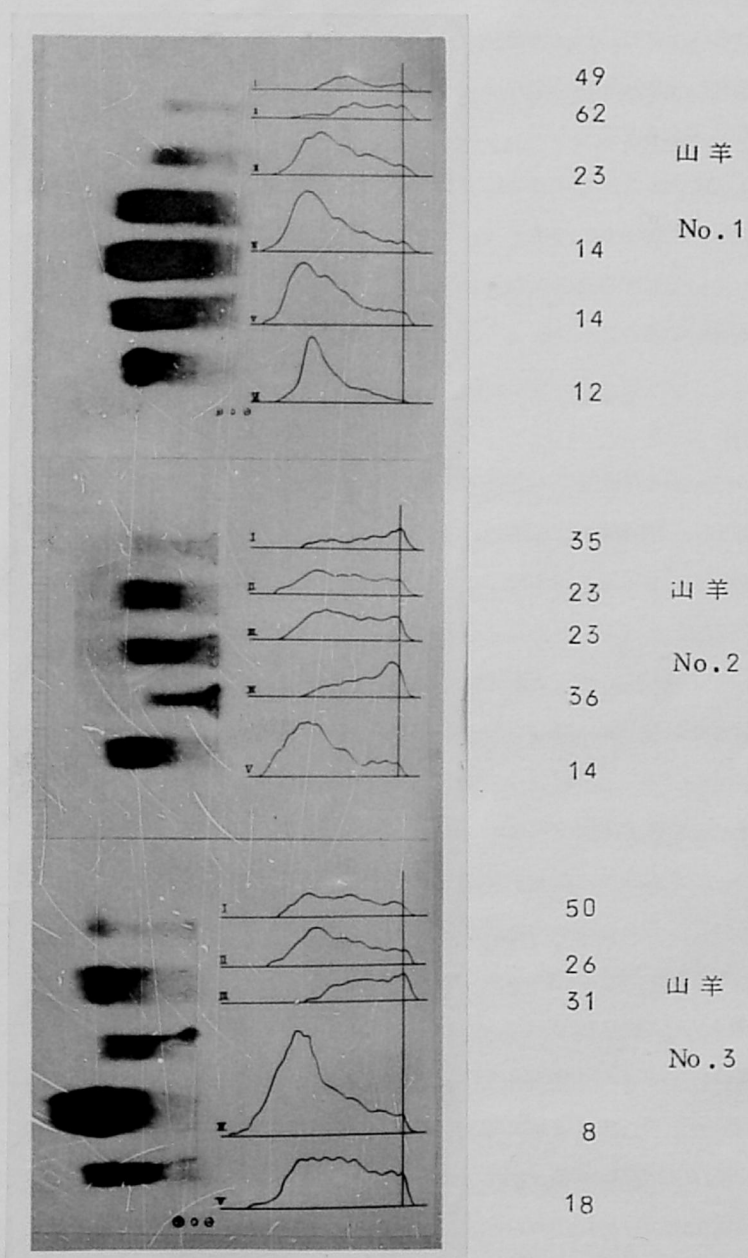
採取方法	精液 試料数	精液量 (ml)	pH (B.T.B)	精子濃度 ($\times 10^8/ml$)	蛋白 (mg/0.1 ml 精液)	酵素活性度		果糖	クエン酸 (mg/dl 精液)
						(/0.1ml 精液)	(/mg 蛋白)		
電気刺激	25	(0.1~0.6)	(6.8~8.8)	(0~82)	(0.6~4.0)	(26~66)	(11~53)	(12~477)	(49~543)
射精液		0.24 \pm 0.12	7.9 \pm 0.6	34 \pm 2.7	1.8 \pm 1.0	41.6 \pm 10.0	29.3 \pm 14.5	170.6 \pm 145.7	246.1 \pm 166.0
人工臍法	18	(0.3~1.0)	(6.2~6.6)	(142~291)	(54~91)	(21~36)	(3~7)	(891~1502)	(540~1037)
射精液		0.62 \pm 0.19	6.3 \pm 0.1	21.7 \pm 5.3	7.1 \pm 1.1	29.5 \pm 4.3	4.6 \pm 1.2	12427 \pm 160.1	7946 \pm 153.3

註：電気射精液の平均値は、ほとんど精子を含まぬ分割についてのものである。

3. 電気射出精液における精漿蛋白の 薄紙電気泳動像

上述の結果からE.S.の精子を含まぬ分割での凝固酵素比活性度が著しく高く、また精子含有分割には精の由来と思われる多量の蛋白が含まれることが推定されたので、凝固酵素蛋白ならびにそれ以外の蛋白について薄紙電気泳動的性質を検討するためにこの実験を行つた。第17図には3頭の山羊について、それぞれ1例ずつの泳動像を示し、同時に薄紙光電光度計による測定値および比活性度

(SA)を図中に併記した。これによると山羊No.1では分割I, IIの比活性度がきわめて高く、III, IV, V, VIではきわめて低かつた。一方泳動像をみると泳動速度の遅い蛋白を多く含む分割の方が速いものよりも比活性度の高いことがうかがわれる。山羊No.2については分割I, IVの比活性度が高く、この分割では泳動速度の遅い蛋白の割合が大きい。またNo.3についても同様な傾向がみられ、比活性度の高い分割I, IIIでは泳動速度の遅い蛋白の割合が多い。これは後述(第7章)のアセトン沈澱法によつて精製された酵素蛋白の泳動状態とよく近似しており、精製酵素蛋白の泳動速度の遅いことから、電気刺激でえられた射出液のうち精子を含まぬ分割では酵素純度の高いことを示すものといえる。3頭の例を通じ



第17図 電気時槽液精製の濾紙電気泳動像

てみるとNo.1の分割Ⅵ, No.2の分割Ⅴ, No.3の分割Ⅳでは泳動速度の速い蛋白がほとんど大部分を占めており, またこれらの分割の比活性度は低い。なおこれらの分割がえられた射出液中の精子濃度は, それぞれ $29.6, 22.6, 19.2 \times 10^8 / ml$ であり, また果糖量はそれぞれ $518.5, 426.2, 639.3 mg/dl$ であつていずれも人工腔による採取精液の数值にかなり類似していた。このような精子や果糖をともなう分割中の蛋白は, 凝固酵素とは無関係であつて主として精のうに由来することが推定された。

以上のことから電気刺戟採取法を応用して低電圧で精子を含みぬ分割を採取すれば高純度の凝固酵素がえられることが考えられ, 酵素の精製にも役立つものと思われる。

第5節 摘 要

山羊精液中の卵黄凝固酵素の活性度に影響を及ぼす要因として, この実験では3頭のザーネン種山羊を用い, 採取季節, 採取回次, 枯渇採取(短時間内連続採取), 電気刺戟採取など主として精液の採取条件をとり上げ, これらが凝固酵素活性度におよぼす影響を検討した。なお精漿成分のうち主として精のうから分泌され则认为られている果糖, クエン酸, 蛋白なども同時に定量し, 酵素活性度との関連性の有無についても比較検討した。

1. 凝固酵素活性度は繁殖季節には非繁殖季節よりも高かつた。
2. 連続3回採取した場合の凝固酵素活性度は採取回次のすすむにつれて上昇した。このことは季節とは無関係に終年みられた。
3. 主として精のうに由来すると考えられる果糖, クエン酸, 蛋白などの濃度は, 繁殖季節には非繁殖季節よりも高かつた。しかし凝固酵素活性度の場合と異り, これら成分の濃度には採取回次による一定の傾向はみとめられなかつた。
4. 精液を人工腔法によつて1時間内に7~8回連続採取して半枯渇状態になるまで採取した精液中の凝固酵素活性度は4~5回目までは急激に直線的に増加し, その後7~8回目まではほぼ一定値を示した。これに対し精液量や精子濃度は回次のすすむに従い低下し, 果糖, クエン酸, 蛋白など精のう由来の成分は3~4回まで上昇し, その後再び低下した。
5. 電気射出精液の精漿中の凝固酵素活性度は $41.6 \pm 10.0 mg/0.1ml$ で, 人工腔法採取精液精漿中の $29.5 \pm 4.3 mg/0.1ml$ にくらべてかなり高く, また比活性度で比較するとそれぞれ $29.3 \pm 14.5 mg/mg$ 蛋白, $4.6 \pm 1.2 mg/mg$ 蛋白となり, 電気射精液の方が約6倍程度も高かつた。
6. 電気射精液精漿の濾紙電気泳動像から, 比活性度の高い精漿では低いものにおけるよ

りも移動度の遅い蛋白の占める割合がはるかに大きく、また比活性度の高い精漿を射出した分割では精子、果糖、クエン酸、蛋白などの濃度が著しく低かった。すなわち低電圧で射出される“精子をほとんど含まぬ”分割では、精のう液成分は少なくて尿道球腺液が多く含まれ、したがって凝固酵素の純度が高い。

第5章 射出精液ならびに副生殖腺液の一般性状 ならびに化学的組成と凝固酵素の存在と の関連性の有無

第1節 緒 言

従来山羊精液と綿羊精液とでは、一般性状においてかなり多くの類似点を有することが知られているが、卵黄緩衝液に対する凝固作用は、山羊精液に特有のものである。綿羊精液の化学的組成についてはすでにかなり多くの研究^{29),30),31),39),40),41)}がみられるが、山羊精液については著者の知る限りにおいては LEIDL^{31),32)}の果糖および 17 KS, Roy et al.⁴²⁾の果糖とアスコルビン酸、広江ら³³⁾の果糖とアスコルビン酸の報告をみるにすぎない。山羊精液の化学的成分、ことに窒素化合物や無機成分については、いまだ明らかにされていないと考えられる。この実験は射出精液ならびに精漿成分の大部分を占めると思われる精のう、前立腺、尿道球腺の分泌液などの化学的性状を明らかにすることを目的とし、またこれらの結果を他の家畜精液のそれらと比較して凝固酵素の存在に関連すると思われるような山羊精液特有の濃度を示す成分がみられるか否かを確かめることも目的として行われた。

第2節 山羊の射出精液の一般性状

化学的組成をしらべる前に、あらかじめ同一精液につき精液、 pH 、精子濃度などの一般性状を検査した。

I 実験の材料、方法ならびに期日

供試山羊は3頭のザーネン種で、試験開始時の年齢はNo.1, No.2は13カ月令, No.3は10カ月令であつて、いずれも健康なものであつた。精液試料は昭和35年4月から昭和37年5月までの25カ月間にわたり、毎月2回その都度3回連続採取し各回の精液を試料とした。精液量は採取管の目盛で読み pH は採取の都度その直後濾紙法(BTB)によつて測定し、精子濃度は THOMA-ZEISS 血球計算盤を使用して算定した。精液の pH は採取後の時間的経過に従つてかなり低下する。これは解糖による乳酸の蓄積がその一因になると考えられるが、本実験では精液採取の現場で採取後30秒以内に測定された。

II 実験成績ならびに考察

1. 精液量と精子濃度

結果は第13表に示すごとく精液量は平均 0.63 ml 、精子濃度は平均 $37.5 \times 10^8 / \text{ml}$

であつた。これは LEIDL³²⁾, 広江³³⁾らの報告する精液量0.7~0.8 ml, 精子濃度 $30 \sim 40 \times 10^8 / ml$ に近似するものである。なお表中にみられるごとく, 繁殖季節と非繁殖季節でこれらの数値にかなり変動があり, 精液量は8月から3月に至る間高く, 逆に精子濃度が低下する傾向がみられた。なお1射精当りの射出総精子数は繁殖季節 22.37×10^8 , 非繁殖季節 24.28×10^8 となり, 年間を通じて大きな変動をみながつた。このような傾向は従来の研究報告と符合するものである。^{32), 43), 44), 45), 46)}また表中のNo.2とNo.3の個体は非繁殖季節に相当する時期に性欲の減退とか精液量の減少がみられたが, とくに精子の生存性の低下, 精子数の減少などの現象はみられなかつた。LEIDL³¹⁾は精液量および精子濃度と精液中の果糖および尿中17-KS量との関係をしらべて, 精液量に大きく影響すると思われる副生殖腺機能は, 男性ホルモンの季節的消長に支配されるが, 造精機能は年間を通じて大きく変動しないと推論している。

2. pH

B.T.B.で6.2~6.7の範囲であつた。これは本実験と同様な測定法を採用している広江³³⁾らの5.8~6.8にほぼ一致していた。

第13表 精液量, 精子濃度およびpH

	山羊 No.	全 平 均	繁殖季節平均	非繁殖季節平均
精液量 (ml)	1	0.80	0.84	0.71
	2	0.52	0.58	0.38
	3	0.57	0.60	0.49
	平均	0.63(0.1~1.8)	0.68	0.53
精子濃度 ($\times 10^8 / ml$)	1	39.00	36.07	44.44
	2	37.00	33.00	46.50
	3	36.00	29.63	47.56
	平均	37.52(16~62)	32.90	46.16
精子総数($\times 10^8$)		23.64	22.37	24.28
pH (B.T.B.)	1		6.54 (6.4~6.7)	
	2	6.49	6.42 (6.2~6.6)	
	3	(6.2~6.7)	6.52 (6.3~6.7)	
精液試料数		135	90	45

第3節 射出精液の化学的組成

I 実験の材料および方法

i) 精液試料： 供試山羊は第2節にのべたと同一のものである。果糖，クエン酸，乳酸，蛋白の測定のための精液試料は，昭和35年4月から昭和37年5月までの25ヵ月間にわたり，毎月2回その都度3回連続採取して毎回次のものを測定し，窒素化合物，磷酸化合物，無機塩類の分析のための精液試料は昭和36年3月から同年12月までの10ヵ月間にわたり毎月1回その都度各山羊から2～3回採取し，各山羊毎に混合して測定した。なお必要に応じ山羊精液と比較の目的で牛，綿羊，豚などの精液も供試された。

ii) 化学的分析法： 分析用の精液試料の調製は第14表I，IIに示す方法で行った。その際試料は採取から分析操作に移るまでに精子，酵素系などの作用による成分の変動を極力さけるために，とくに氷冷に充分留意した。えられた調製試料についてそれぞれ下記のごとき方法によつて定量した。

a) 全窒素，非蛋白窒素および蛋白： 全窒素と非蛋白窒素は試料を硝酸で湿性灰化後，Micro-KJEHLDAHL 法によつて定量した。蛋白は銅-FOLIN 比色法²⁸⁾によつて測定し，アルブミン当量としてもとめた。

b) 果糖，クエン酸および乳酸： 精漿の除蛋白濾液について果糖は ROE 法²⁶⁾，クエン酸は NATELSON 法²⁷⁾，乳酸は BARKER-SUMMERSON 法³⁶⁾によつて定量した。

c) 磷酸化合物： SCHNEIDER⁴⁷⁾によつて分割し，各分割の一定量を取り，過塩素酸で湿性灰化し GOMORI 法⁴⁸⁾によつて比色定量した。

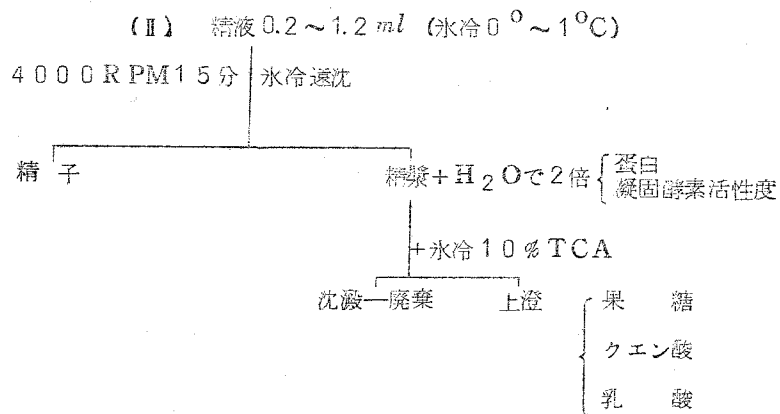
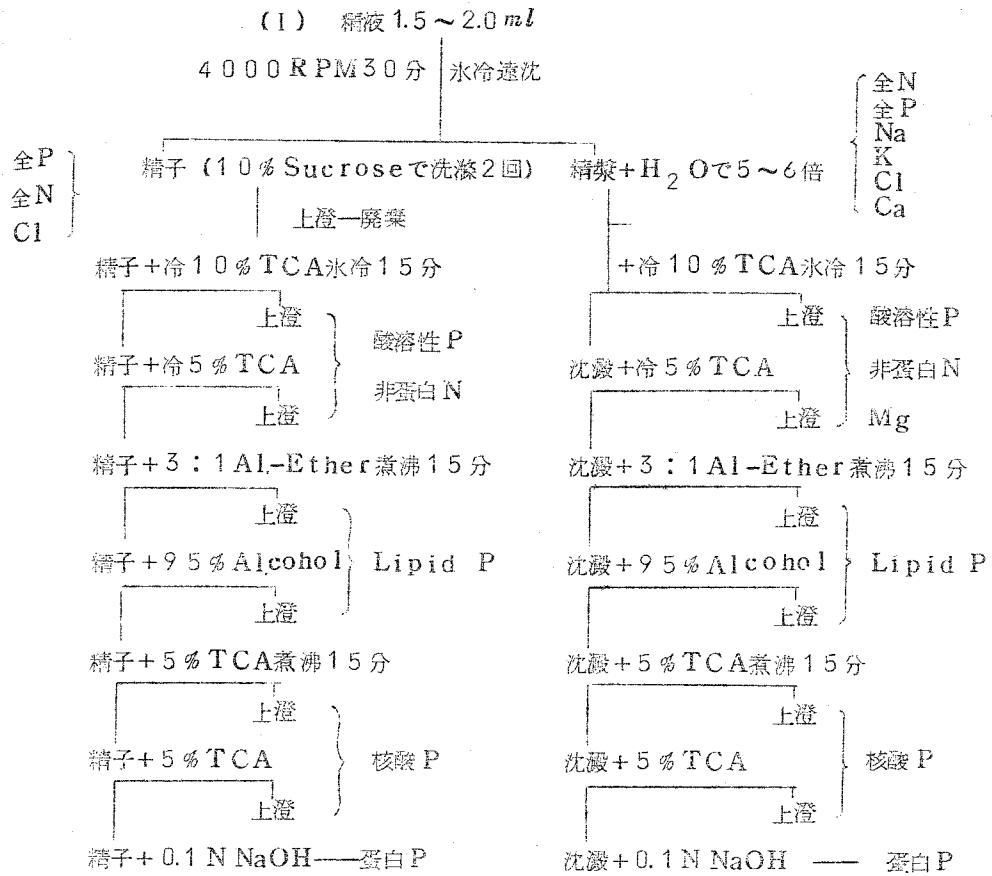
d) 無機塩類： Na と K は MOSKER et al.⁴⁹⁾の方法により伊藤製 BECKMAN QUⅢ型を用いて焰光分析し，Ca は SOBEL の方法⁵⁰⁾，Mg は KUNKEL，PEARSON & SCHWEIGERT の方法⁵¹⁾，Cl は VOLHARDT の方法⁵²⁾に従い定量した。

II 実験成績ならびに考察

1. 全窒素，非蛋白窒素および蛋白

これまで精液中の窒素化合物については牛，馬，綿羊 (MANN⁴⁰⁾)，豚，(McKENZIE et al.⁵³⁾)，人 (HUGGINS et al.⁵⁴⁾) の報告がみられるが，山羊精液についての報告は著者のしらべた範囲ではみあたらない。MANN や HUGGINS et al. の成績は精液として分析されたものが多いが，この実験では精液を精漿と精子にわけて定量した。その結果は第15表に示される。精漿と精子の全窒素は各々 $87.15 \pm 14.88 \text{ mg/dl}$ と 268.0

第14表 分析試料の調製



第15表 精液中の窒素化合物

	山羊 No.	精 漿 (mg/dl)			精 子 ($r/10^8$ 精 子)全平均	精 漿 (mg/dl)		
		全平均	繁殖季節 平均	非繁殖季節平均		綿羊	牛	豚
全窒素	1	803.1	820.6	785.6	321.0	861.5 ±65.6	955.5 ±305.8	304.7 ±79.9
	2	871.8	901.2	842.4	210.8			
	3	947.2	1039.0	874.0	258.0			
	平均	871.5 ±148.8	911.8	834.0	268.0 ±97.2			
非蛋白 窒 素	1	214.4	231.6	197.2	255	60.1 ±12.1	73.4 ±22.0	27.9 ± 4.2
	2	293.5	246.0	350.4	17.5			
	3	382.5	281.0	504.4	32.0			
	平均	299.4 ±156.6	254.1	350.7	25.0 ±10.6			
精液試料数		35	20	15	24	4	8	7
蛋 白 (g/dl)	1	5.5	6.5	4.1				
	2	4.0	5.4	2.2				
	3	5.1	6.6	2.3				
	平均	4.6 ±2.0	6.1	2.9				
精液試料数		330	206	124				

±97.2 $r/10^8$ 精子で、前者はいずれの個体についても繁殖季節の方がやゝ高かつた。非蛋白窒素は精漿と精子で各々 $299.4 \pm 156.6 \text{ mg/dl}$ と $25.0 \pm 10.6 r/10^8$ 精子で、前者は上記の全窒素の場合と逆に非繁殖季節に高いようであり、この傾向はとくにNo.3の山羊において著しかつた。なお牛、綿羊、豚などの精漿についても山羊の場合と同様に全窒素、非蛋白窒素を定量し、山羊のそれらと比較されたが、全窒素は牛と綿羊に近似し、豚のそれよりも高い値を示した。しかし山羊精漿中の非蛋白窒素は牛、綿羊および豚のいずれの精液よりも著しく高かつた。JACOBSON(1950)⁵⁵⁾ が人精液で射精後の時間的経過にともなつて蛋白質性窒素が酵素作用によつて非蛋白性窒素とか遊離アミノ酸に分解されることを報告し、この現象はとくに人精液において著しいとのべているが、本実験においてはこの点を考慮してとくに採取後直ちに氷冷しできるだけ早く除蛋白することに留意した。なお山羊精液特有の卵

黄凝固酵素は第8章にのべるとくフオスフォリパーゼに属するものであり、したがって非蛋白窒素量がとくに山羊精漿に多いこととこの酵素の存在とはほとんど関係ないものと思われる。つぎに精漿中の蛋白は比色法によつてアルブミン当量としてもとめたものであるが、全体の平均値で4.6 g/dl で繁殖季節の方が非繁殖季節におけるよりもはるかに高かつた。

2. 果糖, クエン酸および乳酸

果糖, クエン酸および乳酸の濃度については, 精漿だけが供試された。結果は第16表に示すように年間平均値で果糖は707.7 mg/dl, クエン酸は384.0 mg/dl, 乳酸は39.3 mg/dl で果糖は³²⁾ LEIDL や³³⁾ 広江らの報告にほぼ近似していた。なお季節との関係は既述のごとくこれら3者とも繁殖季節に濃度が高く, この傾向はとくに果糖において著しかつた。MANN,⁵⁶⁾ LEIDL³²⁾ によれば果糖は精のうで生産され, またアンドロゼンの季節的消長にともなつて変異するものと考えられているが, 上記の実験結果からもこのことが推定された。なお個体別の数値をみると果糖およびクエン酸についてはNo.1が最も高く, No.3, No.2がこれについている。

第16表 果糖, クエン酸および乳酸濃度 (mg/dl 精漿)

	山羊 No.	全 平 均	繁殖季節 平均	非繁殖季節 平均
果 糖	1	812.7	1129.1	479.8
	2	575.5	945.5	185.6
	3	737.9	1041.6	223.3
	平	707.7	1039.1	304.8
	均	(20~1594)	±305.2	±255.6
クエン酸	1	456.3	488.2	423.1
	2	309.0	435.8	145.9
	3	386.9	461.6	222.9
	平	384.0	460.9	276.0
	均	(57~714)	±114.7	±99.1
乳 酸	1	43.4	45.3	42.4
	2	37.8	39.9	28.8
	3	36.5	38.6	29.6
	平	39.3	42.1	32.1
	均	(12~92)	±12.5	±7.4
精液試料数		330	206	124

3. 磷酸化合物

磷酸化合物は精漿と精子にわけて定量された。また山羊精液特有の卵黄凝固酵素が後述のごとくフオスフォリパーゼの一種であると考えられることから、磷脂質との関連において山羊精液中の脂質濃度を明らかにするために各種の磷酸化合物を分割して定量した。結果は第17表に示すごとくで、精漿中の濃度は年間平均値で酸溶性磷 215.4 ± 54.2 、脂質磷 26.9 ± 7.4 、核酸磷 3.8 ± 1.8 、蛋白磷 $21.8 \pm 0.8 \text{ mg/dl}$ で、このうち酸溶性磷は繁殖季節に

第17表 精液中の磷酸化合物および無機塩類

		精漿 (mg/dl) 全平均	精子 ($r/10^8$ 精子) 全平均
磷 酸 分 割	Total	268.0 ± 49.5 (200~366)	90.3 ± 24.7 (50~155)
	酸溶性	215.4 ± 54.2 (126~303)	23.4 ± 12.1 (7~44)
	脂 質	26.9 ± 7.4 (13~43)	7.2 ± 4.1 (2~16)
	核 酸	3.8 ± 1.8 (0 ~ 10)	38.8 ± 16.7 (26~58)
	蛋 白	21.8 ± 0.8 (11~42)	22.7 ± 9.8 (3~46)
無 機 塩 類	Ca	11.3 ± 2.5 (5~15)	2.5 ± 1.5 (1~5)
	Na	103.5 ± 37.0 (60~183)	10.2 ± 9.4 (3~17)
	K	158.3 ± 55.1 (76~255)	9.8 ± 3.6 (4~14)
	Mg	3.2 ± 1.1 (1.4~4.4)	—
	Cl	125.4 ± 34.0 (82~215)	微 量 (0~9.3)
精液試料数		29	24~29

は 163.8 mg/dl 、非繁殖季節には 232.8 mg/dl 、脂質磷はそれぞれ 30.8 mg/dl 、 23.1 mg/dl となり、繁殖季節には酸溶性磷がやや少く脂質磷が多いようであつた。つぎに精子中の濃度は年間平均値で酸溶性磷 23.4 ± 12.1 、脂質磷 7.2 ± 4.1 、核酸磷 38.8 ± 16.7 、蛋白磷 $22.7 \pm 9.8 r/10^8$ 精子であつた。また精漿と精子を比較すると精漿中で

は酸溶性磷がほとんど大部分を占め、精子中では核酸磷がもつとも多く脂質磷や酸溶性磷は比較的少なかった。 $MANN^{57)}$ は綿羊精液について同様なことを報告しており、とくに精漿中には核酸磷は皆無であるとのべている。なお凝固酵素に関連があるのではないと思われた脂質磷については、牛や綿羊の精液中の濃度⁴⁰⁾と比較して特異な濃度を示さず、ほぼ同程度の濃度であつた。

4. 無機塩類

無機塩類の濃度は精漿と精子にわけて定量されたが、その結果は第17表に示すごとく精漿中の濃度は $Ca\ 11.3 \pm 2.5$, $Na\ 103.5 \pm 37.0$, $K\ 158.3 \pm 55.1$, $Mg\ 3.2 \pm 1.1$ $Cl\ 125.4 \pm 34.0\ mg/dl$ で、こころみにこれらを綿羊の精液について測定した $MANN^{40)}$ の成績と比較してみると Ca , Na , Mg については大差はみられなかつたが、 K と Cl は綿羊の $74\ mg/dl$, $86\ mg/dl$ に比して山羊の方が幾分高かつた。なお精子中には Cl はほとんどみとめられなかつた。

第4節 山羊副生殖腺液の化学的性状

従来家畜の副生殖腺分泌液の化学的組成については牛、豚、綿羊、兎などについてはかなり多くの報告がみられるが、山羊についての成績は著者のしらべた範囲ではほとんどみられない。既述のごとく山羊精液には特有の卵黄凝固酵素が含まれ、これはまた尿道球腺分泌液に由来することが知られているので(第6章)、この実験では尿道球腺、精のうおよび前立腺の分泌液の化学的組成を明らかにし、とくに尿道球腺分泌液の各種成分の濃度について特異性の有無を検討した。

I 実験の材料および方法

山羊5頭について屠殺後ただちに尿道球腺、精のう、前立腺を剔出し、できるだけ速かに腺体に附着した筋組織や脂肪組織を除き、溜水で洗滌したのち水分を濾紙で除き、秤量後腺体に数カ所メスを入れ、軽く圧力を加えて分泌液を採集した。なお山羊の前立腺は尿道壁をとりまく伝播部が大部分で、採取試料片が少いのでやや圧力を加えて圧出した。したがつて真の分泌液とは異り、血液の混入も予想される。かくしてえられた試料液についてガラス電極 pH メーターによつて pH を測定したのち、いずれも溜水で5~10倍に稀釈して精漿の場合と全く同様の方法で各種化学的成分を定量した。

II 実験成績ならびに考察

1. 乾物量および pH

測定結果は第18表に示される。乾物量は尿道球腺分泌液のみについて測定した。3例の平均値で9.9 g/dlであつた。pHは精のうおよび前立腺のものは中性に近いが、尿道球腺分泌液のpHはかなり高く8.3±0.14であつた。このように卵黄凝固酵素の生産部位である尿道球腺分泌液のpHが高いにもかかわらず、射出精液中の酵素の卵黄に対する凝固作用の最適pHが6.0であつてかなり低く、両者の食違いは体内外における酵素の安定性とpHとの関連性という点で興味ある問題である。なお尿道球腺分泌液のpHが高いのは後述のごとく陽イオン側のイオン平衡に関与すると考えられるK⁺が多く、逆にクエン酸濃度の低いことによるものではないかと思われる。

2. 窒素化合物

全窒素および非蛋白窒素ともにいずれの腺の分泌液でも精漿よりもかなり高い濃度を示し、ことに尿道球腺分泌液の非蛋白窒素が多く796.7 mg/dlであつた。これは牛、山羊および豚などの精漿中よりもはるかに非蛋白窒素の多い山羊精漿中の濃度のさらに2.5倍に相当するものである。このように精漿中の非蛋白窒素濃度の低いのは、射精の瞬間に尿道球腺分泌液が射出精漿の大部分を占めると考えられる精のう液で稀釈されることによると考えられる。この非蛋白窒素にはトリクロール酢酸溶性のおそらくプロテオースに類する成分がかなり含まれるのではないかと考えられ、その裏付けの一つとしてBaOHとZnSO₄で除蛋白した濾液について測定した非蛋白窒素は563.1±35.4 mg/dlであつて、トリクロール酢酸除蛋白

第18表 山羊副生殖腺分泌液の化学的組成 (3~4例平均)

		尿道球腺	精のう	前立腺
乾物 (g/dl)		9.9 ± 1.10		
pH (電極法)		8.3 ± 0.14	7.0 ± 0.14	7.1 ± 0.03
全窒素		1712.6 ± 61.5	1512.4 ± 35.20	2050.5 ± 229.2
非蛋白窒素		796.7 ± 45.2	312.3 ± 76.4	460.6 ± 145.3
蛋白 (g/dl)		6.2 ± 1.4	10.5 ± 2.9	12.3 ± 1.8
果糖		45.1 ± 15.9	811.3 ± 115.2	11.1 ± 0.2
クエン酸		25.4 ± 6.2	265.3 ± 108.5	5.1 ± 3.2
乳酸		124.4 ± 5.9	396.0 ± 91.6	192.7 ± 17.6
有機酸	Total	123.6 ± 29.1	142.6 ± 17.7	164.1 ± 69.9
	酸溶性	96.0 ± 27.5	89.7 ± 10.3	121.3 ± 67.5
	脂質	7.5 ± 1.2	27.7 ± 4.9	54.4 ± 5.1
	核酸	4.4 ± 2.6	4.7 ± 2.9	12.0 ± 7.1
無機塩類	蛋白	6.8 ± 1.2	18.4 ± 2.1	9.2 ± 2.9
	Ca	41.2 ± 12.0	14.3 ± 4.0	
	Na	196.8 ± 84.2	297.0 ± 38.5	231.7 ± 43.3
	K	735.6 ± 185.5	200.3 ± 16.1	
	Mg	2.6 ± 1.7	21.7 ± 5.5	2.9 ± 1.5
	Cl	194.4 ± 44.5	122.5 ± 41.0	102.6 ± 11.8

註：乾物と蛋白以外の成分の濃度はmg/dlで示された。

濾液での 79.67 mg/dl よりもかなり低いことがあげられる。

また蛋白質量は比色法でアルブミン当量として求めたものであるが、精のうおよび前立腺の分泌液中に多く、精漿中の約 2 倍程度の濃度であつた。

3. 果糖、クエン酸および乳酸

果糖は第 18 表に示すごとく精のう分泌液に特異的に多量に含まれ、精漿中のこれらの成分は大部分が精のうに由来することを暗示している。このことは次記のごとく人や牛、豚、綿羊などにおける文献と一致するものである。精液中の還元糖が精のうに由来することは人

(HUGGINS AND JACOBSON⁵⁸⁾、牛 (BERNSTEIN⁵⁹⁾、綿羊 (MOORE AND MAYER⁶⁰)、豚 (MCKENZIE, MILLER AND BAUGUËSS⁵³) について報告され、その後これらの糖が果糖であることが MANN⁶¹ によつてたしかめられた。

クエン酸もまた精のうに多く尿道球腺や前立腺には少量しか含まれていないが、このことも既往の他の家畜における文献と一致している。HUMPHREY AND MANN⁶² は豚、牛、兎などの生殖器官についてクエン酸の分布をしらべ、牛では精のう膨大部精液に多く、また精巢上体に少量含まれること、豚では精のうに大部分、前立腺に少量含まれることを報告している。乳酸はいずれの腺でも精漿中の濃度よりもはるかに高く、とくに精のう液中に多い。

4. 磷酸化合物

副生殖腺分泌液中の磷酸化合物の濃度は第 18 表に示される。これらを既述の精漿中の濃度と比較してみると、全量および酸溶性磷の濃度において精漿中の濃度よりもかなり低い。また脂質磷は尿道球腺に少なく、前立腺ではかなり高濃度であつた。前立腺分泌液中の核酸磷が上述の脂質磷とともに他の 2 者にくらべやや多いようであるが、その原因については前立腺液の分析試料が完全な分泌液ではなく、圧出した際の細胞内液の混入によるものかもしれないが、確言しがたい。また蛋白磷については精のう分泌液では精漿中の濃度と大差はないが、尿道球腺や前立腺ではかなり少いようであつた。

5. 無機塩類

結果は第 18 表に示すごとく、尿道球腺分泌液では Ca と K、とくに後者の濃度が精漿中の濃度よりもはるかに高く、このことがまた上記の尿道球腺分泌液の pH の高い一因をなしているかと思われる。精のう分泌液では Na と Mg が多く、とくに Mg の濃度は精漿中の約 10 倍程度であつた。前立腺の成績は試料採取が困難であつたため、例数も少く判断はできないが、大体精漿中の濃度に近似していた。なお Cl はいずれの腺の分泌液でも精漿中の濃度と同程度であつた。

本章の実験によつて山羊の射出精液や副生殖腺液の化学的組成が明らかにされたが、そのうち精漿や尿道球腺液には、他の家畜にくらべて非蛋白窒素の濃度をはるかに高いことが知られたが、このことは卵黄凝固酵素の存在とは関係ないものと思われる。すなわち後述のごとくこの凝固酵素はフォスホオリパーゼの一種であつて、蛋白分解酵素ではない。また凝固酵素の存在に最も関連深いと考えられた脂質磷の濃度も他の家畜に比して特異的な濃度を示さないことが知られた。

以上によつて山羊精液中には、他の家畜精液にくらべて卵黄凝固酵素が特異的に存在するが、この酵素以外に他の化学的組成のうち酵素の存在に関連して特異的な濃度を示すような成分はみとめられなかつた。

第5節 摘 要

山羊精液の化学的組成については報告が少なく、いまだ明らかにされていない成分もかなりみられる。この実験では3頭の山羊について1～2カ年間にわたつて採取した精液につき化学的組成を検討し、また5頭の雄山羊の副生殖腺液の組成もしらべた。これによつて山羊精液の化学的組成を明らかにし、また山羊精液には特有の卵黄凝固酵素を含むので、この存在に関連して特異濃度を示す成分の有無をあわせて検討した。

1. 山羊の精液量は 0.63 ml ($0.1 \sim 1.8\text{ ml}$)、精子濃度は $37.5 \times 10^8 / \text{ml}$ ($16 \sim 62 \times 10^8 / \text{ml}$) で精液量は繁殖季節に多く、精子濃度はむしろ非繁殖季節に高い傾向がみられた。精液の pH は濃紙法で測定して6.5 (BTB) であつた。

2. 山羊精漿中の全窒素は牛、綿羊のそれらと大差はなかつたが、非蛋白窒素 (トリクロル醋酸溶性) はかなり多く、牛、綿羊の約4倍、豚の約10倍程度であつた。また精漿中の果糖、クエン酸はそれぞれ 707.7 mg/dl , 384.0 mg/dl であつて、ほぼ牛や綿羊の精液中の濃度に近似していた。なおこれらの成分は蛋白量とともに年間変異を示し、繁殖季節に高くなる傾向がみられた。

3. 精液中の燐酸化合物については、精漿中には酸溶性燐が多く核燐はきわめて少なかつた。また無機塩類のうちK, Cl が綿羊のそれらよりも幾分高いようであるが、Ca, Na, Mgの濃度では大差はなかつた。

4. 山羊副生殖腺液の性状については、尿道球腺液の pH は精のう、前立腺にくらべて高く、電極法で8.3であつた。全窒素はいずれの腺においても精漿中の濃度よりも高く、非蛋白窒素は尿道球腺にとくに多いようであつた。果糖、クエン酸は精のう液中に圧倒的に多く、他

の2者ではきわめて少なかった。磷酸化合物のうち全量と酸溶性磷の濃度は精漿中の濃度よりもむしろ少なかった。Ca, Kは尿道球腺液に多く, Mgは精のう液中に高濃度にふくまれていた。

5. 以上によつて山羊精液の一般性状ならびに化学的性状につきある程度の知見がえられたが, 本実験の範囲内では牛や緬羊の精液とくらべてとくに凝固酵素の存在に関連すると思われるような成分すなわち, 脂質磷や無機塩類について特異的な濃度を示す成分はみとめられなかった。

第6章 凝固酵素の所在と由来

第一節 諸 言

第1章第2節にのべたように凝固酵素は山羊精液のうち、精子とは無関係に精漿中に存在することが明らかにされ、このことから凝固酵素は生殖器官に存在するいずれかの臓器に由来することは容易に想像される。本実験では、生殖器官中の各臓器抽出液について凝固酵素活性度を測定して酵素の分泌臓器をたしかめ、ついで酵素が由来すると考えられる臓器を手術によって剔除し、剔除動物の精液中の酵素活性度の有無を検討して分泌臓器を再確認せんとした。また分泌臓器中での凝固酵素の組織化学的検索もこころみた。

第2節 各種生殖器官臓器における凝固酵素の有無

I 実験の材料および方法

雄山羊14頭を9月から11月に至る繁殖季節中に屠殺し、屠殺直後精巢、精巢上体、精管精のろ、前立腺および尿道球腺を剔出し、各臓器を別々に笹川ら^{63), 64)}の方法に準じて粉末ドライアイスとともに乳鉢で搗細し、倍量の氷水を加えてペースト状にしたものを、約1,500G・30分間遠沈してできた上澄液をそれぞれの組織抽出液とし、この抽出液0.1mlを20%卵清液1mlに加えて40°Cに3時間保管して卵黄凝固の有無をみた。なおこの場合の酵素活性度は濁度で示した。

II 実験成績ならびに考察

14頭の雄山羊について各種生殖器官臓器抽出液の酵素活性度を測定した結果をそれぞれ範囲と平均値で示せば第19表のとおりである。

第19表 生殖器官臓器抽出液中の凝固酵素の有無(14例)

臓 器 の 種 類	酵 素 活 性 度 [濁度(500mμ)]	
	範 囲	平 均
精 巢	0 ~ 3	1.0
精 巢 上 体	0 ~ 1	≒ 0
精 管	0	0
精 の ろ	0 ~ 12	1.5
前 立 腺	0 ~ 47	6.3
尿 道 球 腺	4 ~ 165	85.4

これによつて精巢、精巢上体、精管、精のうおよび前立腺の抽出液には凝固酵素は存在せず、尿道球腺にのみ存在することが推定された。なお上表から尿道球腺以外の精巢、精のうおよび前立腺が稀にはごく弱い酵素活性を示すような印象をうけるが、これはおそらく試料採取の操作中に尿道球腺液が誤つて混入したものと思われ、このことは尿道球腺に最も隣接して存在する前立腺において著しい。

以上の尿道球腺に由来するという結論は Roy⁹⁾ の実験結果と一致する。なお14頭のうちの1例においてのみ前立腺抽出液にかなり強い凝固性がみとめられたが、これは前立腺伝播部と尿道球腺が隣接しているために、尿道球腺分泌液の混入が比較的強かつたのではないかと思われる。

つぎにこれら尿道球腺抽出液を $-5 \sim -8^{\circ}\text{C}$ に凍結保存した場合にその凝固機能が保存中どの程度に維持されるかを知らんとして2カ年間にわたり、卵黄に対する酵素作用を測定した。なお、この場合も酵素活性度の測定は初期に用いられた濁度法によつて行い、その後開発された脂肪酸法は用いなかつた。結果は第20表に示すように、2カ年を経てもなお十分凝固機能を維持することが知られた。Roy⁹⁾も抽出液に1滴のクロロホルムを加えて氷室に6週間保

第20表 尿道球腺抽出液の保存中(-8°C)の酵素活性度[※]

山 羊 No.		1	2	3	4	5	6	7	8	9
尿 道 球 腺 重量(両側計, g)		5.0	2.2	0.4	3.5	6.2	3.0	3.0	4.3	3.8
保 存 期 間 (月)	0	83	90	4	80	85	95	90	91	96
	1	86	87	2	75	82	85	88	92	89
	2	85	89	-	-	75	87	85	87	79
	4	76	75	-	64	76	80	77	80	70
	12	75	80	-	-	-	77	60	84	85
	24	70	75	-	-	80	80	65	80	80

注: ※濁度
-は測定せず

存し、凝固機能の低下しないことを報告しているが、このように凝固機能が保存によつてあまり低下しないことは、凝固酵素入手面でこの種の実験を行う上にきわめて便利である。なお尿道球腺の重量と凝固作用の強さとの間にNo.3の1例を除き、特定の関係はみられなかつた。

No.3の例は生後8カ月であつたが、とくに体の発育が悪く尿道球腺の大きさも著しく小さく、

酵素活性度もきわめて低かった。このことから尿道球腺の機能と凝固酵素の分泌との間に関連性のあることが推察された。ちなみにNo. 3 と同腹の他の個体では、生後7カ月で精液採取が可能であり、その精液にすでに著しい酵素活性 がみとめられた。

第3節 尿道球腺の剔除と精液中の凝固酵素活性度

前節の実験結果から凝固酵素が尿道球腺分泌液に由来することが知られたので、このことの確認を主たる目的としてこの実験では尿道球腺の剔除をこころみ、施術山羊の精液につき凝固酵素活性度を測定し剔除による消失の有無をしらべ、あわせて精液の一般性状、果糖、クエン酸、蛋白濃度なども測定して結果の検討に参照された。

Ⅰ. 実験の材料および方法

1. 供試動物および実験期間： 供試山羊は健康なザーノン種山羊2頭であつて、年齢はそれぞれ4年5カ月と5年3カ月のものであつた。実験期間は昭和37年9月～38年3月に至る間であつた。

2. 尿道球腺剔除手術： 山羊は第18図-Iのように横臥させて保定し、ネムブタールで全身麻酔し、肛門下部 約1 cm のところをプロカインで局部麻酔して4～5 cm 幅に切開し(第18図-II)、括約筋、直腸、尿道の3者を傷つけないように注意しつつ開創し、主として指頭による触診で約4 cm の深さにある尿道球腺を鉗子でひき出し(第18図-III)、結紮せずにできるだけ腺体基部まで切除した。開創面にはサルファ剤を塗布し、表皮のみ縫合した。術後5～7日で抜糸し約7～10日で精液採取の可能な状態になつた。

3. 酵素活性度および化学的成分の測定： 剔除前と後における採取精液について一般性状を検査した後、遠心分離によつて精漿を分離し、酵素活性度は第3章第2節と同様の方法で脂肪酸量を測定してその数値で示し、果糖は ROE 法²⁶⁾、クエン酸は NATELSON 法²⁷⁾、蛋白は銅-FOLIN 法²⁸⁾によつてそれぞれ測定、定量した。

このほか剔除した尿道球腺内容液の酵素活性度についても測定された。測定方法は上記精漿の場合と同じである。

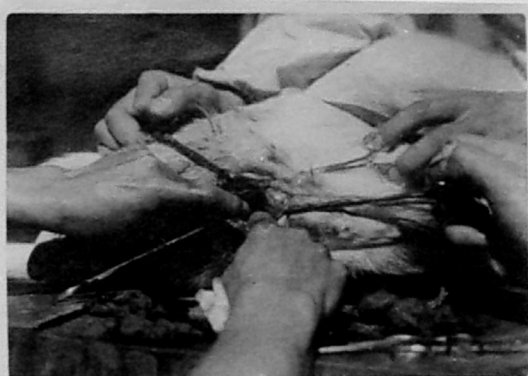
Ⅱ 実験成績ならびに考察

1. 精液中の酵素活性度および化学的組成

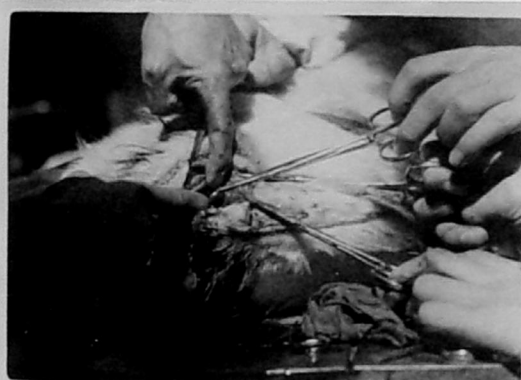
実験成績は各個体ごとにまとめて図示した。いずれも上図に精液量と精子濃度を、下図に酵素活性度と果糖、クエン酸、蛋白濃度を示した。これらの数値はいずれもその都度2～3回連続採取した精液についての結果の平均値である。山羊No. 18 では第19図に示すように精



I. 切開部位……



II. 指頭による触診



III. 尿道球腺の剔出

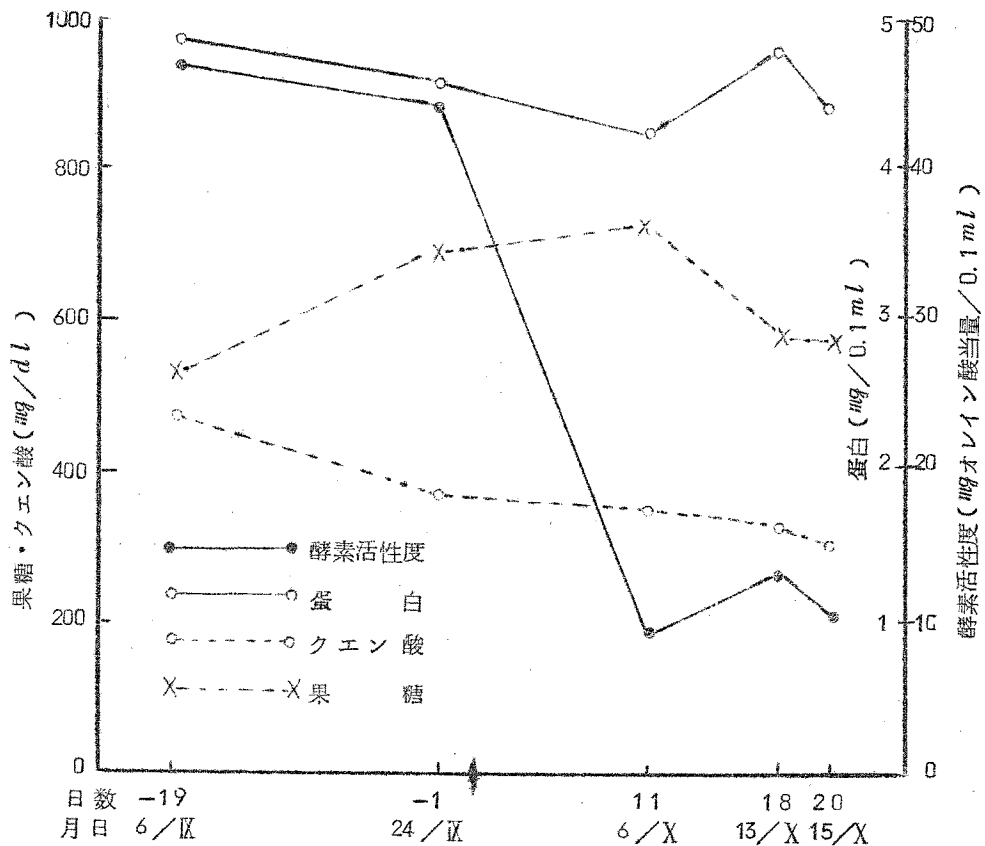
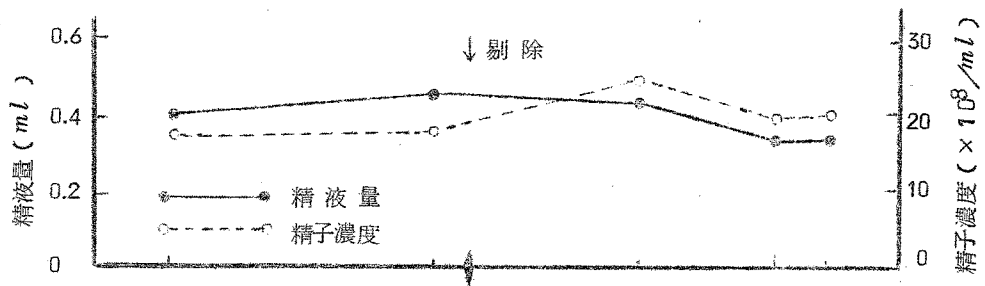


IV. 縫 合

第18図 尿道球腺剔除法

液量および精子濃度には剔除の影響はほとんどみとめられなかつた。また剔除の前後で果糖，クエン酸，蛋白濃度などもほとんど変化はみられなかつた。凝固酵素活性度は剔除前に約 $40 \text{ mg}/0.1 \text{ ml}$ 程度であつたものが剔除後約 $10 \text{ mg}/0.1 \text{ ml}$ すなわち $1/4$ 程度にまで低下した。しかし剔除後20日を経ても完全には消失することはない，ほぼ $10 \text{ mg}/0.1 \text{ ml}$ 前後を維持していた。この山羊は術後約1カ月で手術とは無関係に斃死した。

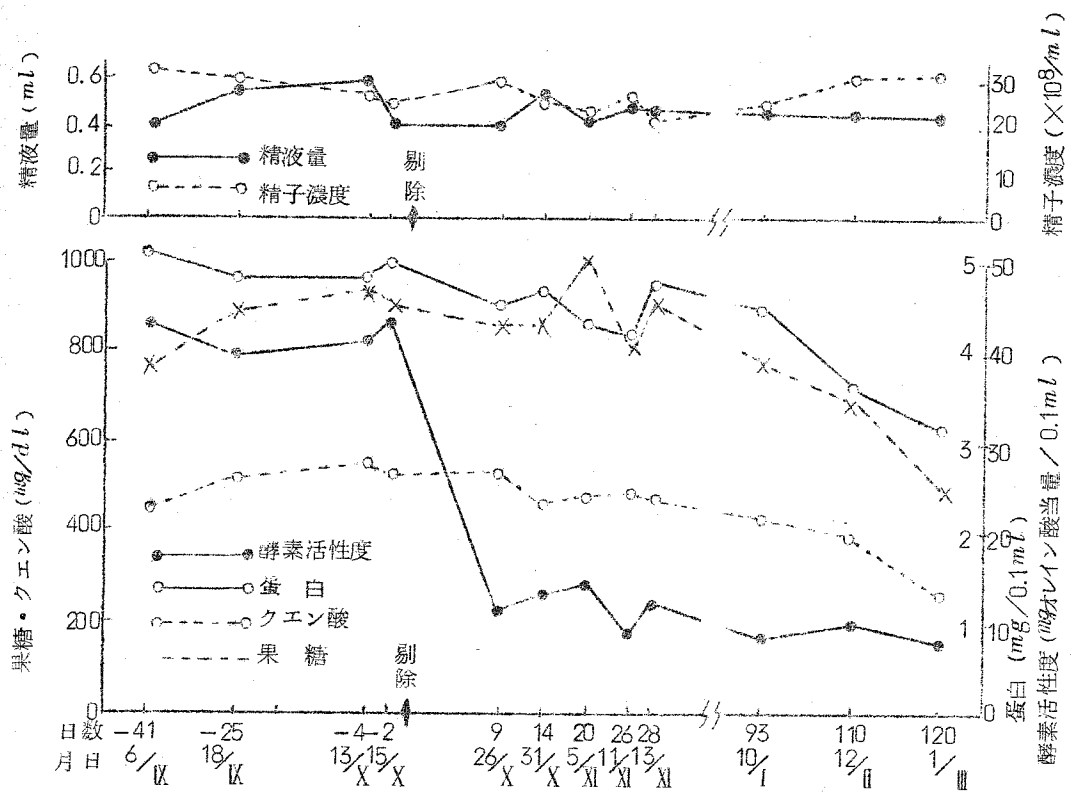
つぎに山羊No. 2 についての結果を第20図に示した。これによると精液量や精子濃度は上記No. 18と同じく剔除の前後でほとんど変化はなく，酵素活性度は剔除によつて急激に低下した。しかしこの場合も完全には消失することはない，4ヶ月後もなお低いながら酵素活性を示した。また果糖，クエン酸，蛋白にはほとんど変化はなく，ただ2月中旬以降になつて



第19図 尿道球腺の剔除が酵素活性度および精液性状に及ぼす影響 (No. 18)

これらの成分は低下の傾向にあるが、例年この時期になるとこの山羊では季節的な影響があらわれて、低下しはじめることが知られているのでこれは剔除の影響とは考えられない。

つぎに測定項目別に剔除前後の平均値を表示すると第21表に示すとおりである。これによると酵素活性度のみが剔除の前後で有意に低下することが知られた。すなわちNo. 18では $45.3 \text{ mg}/0.1 \text{ ml}$ から $10.3 \text{ mg}/0.1 \text{ ml}$ に、No. 2 では $42.6 \text{ mg}/0.1 \text{ ml}$ から



第20図 尿道球腺の剔除が酵素活性度および精液性状に及ぼす影響 (山羊No. 2)

第21表 尿道球腺剔除前後における酵素活性度と精液性状

山羊 No.		試料 数	精液量 (ml)	精子濃度 ($\times 10^8/ml$)	酵素活性度 ($mg/0.1ml$)	蛋白 ($mg/0.1ml$)	果糖 (mg/dl)	クエン酸 (mg/dl)
18	剔除前	6	(0.3~0.5)	(17~23)	(39~57)	(4~6)	(367~891)	(237~597)
			0.43	18.6	45.3	4.6	621.2	396.2
18	剔除後	7	(0.3~0.7)	(15~33)	(8~15)	(4~6)	(515~874)	(220~451)
			0.40	23.4	10.3**	4.5	626.5	328.6
2	剔除前	8	(0.3~0.7)	(20~35)	(35~45)	(4~7)	(719~1020)	(453~591)
			0.48	27.7	42.6	5.4	890.4	516.4
2	剔除後	19	(0.3~0.6)	(19~36)	(6~15)	(3~5)	(451~1120)	(258~582)
			0.46	26.4	10.7**	4.3	836.6	441.3

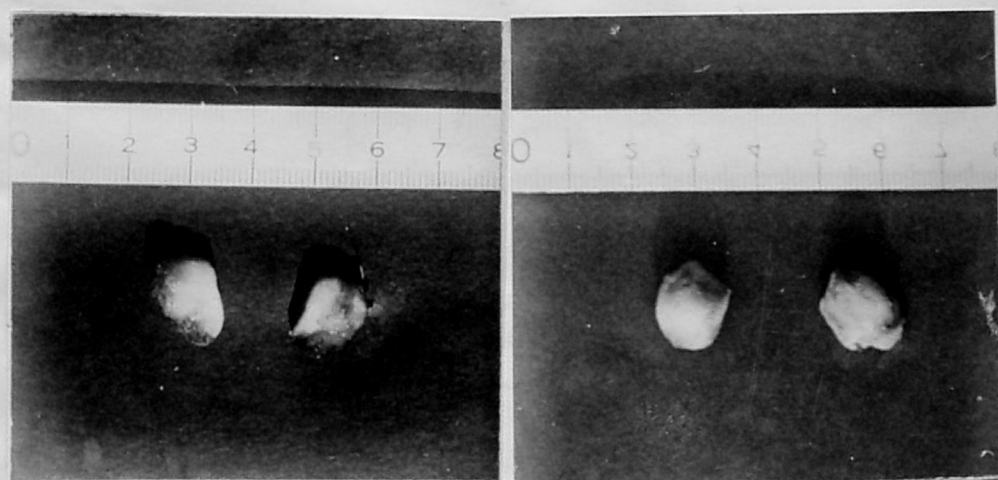
** $P < 0.01$

10.7 μ g/0.1 ml に低下した。その他の項目については剔除の前後でほとんど差はみられなかつた。これらの結果から少くとも尿道球腺が酵素の主な分泌源になつてゐることが明らかになつた。一方果糖、クエン酸、蛋白などは剔除の前後でほとんど差はみられなかつたが、このことによつて第5章第4節でのべたようにこれら3成分は尿道球腺とは無関係に主として精のうに由来することが裏づけされた。

2. 尿道球腺内容液の酵素活性度

つきにこの実験で剔除された各山羊の尿道球腺(第21図)についてそれぞれ抽出液の酵素活性度を測定してみたところ、第22表に示すごとくNo.18では1722.2 \pm 230.8 μ g/0.1 ml, No.2では2367.8 μ g \pm 155.8 μ g/0.1 ml 抽出液であつてこれらは精漿中の活性度の約30~50倍に相当する強力なものであつた。

このことから剔除後もし少量の組織でもとり残しがあるとかなりの酵素活性度が精漿中に残ることが推察された。



山羊 No. 18

山羊 No. 2

第21図 剔除尿道球腺

第22表 剔除尿道球腺抽出液の凝固酵素活性度

山羊 No. 18	山羊 No. 2
1722.2 \pm 230.8	2367.8 \pm 155.8

注：酵素活性度：脂肪酸量(μ gオレイン酸当量/0.1 ml)

第4節 尿道球腺組織における凝固酵素の組織化学的検索

前節にのべたごとく尿道球腺剔除によつて山羊の射出精液中の酵素活性度は著しく低下するが、しかし完全には消失しなかつた。この原因としてこの度の手術における組織残存の可能性および残存組織中の酵素生産の可能性が考えられた。もし細密な検査の結果残存組織がないとすれば尿道球腺以外の酵素分泌機構を考えざるをえないことになる。この実験では、このことを確認するために尿道球腺組織の残存の有無と残存組織があるとすれば酵素生産の有無につきしらべようとした。

1. 実験の材料および方法

実験には前節で使用した山羊とは異なる2頭のザーネン種山羊を使用し、屠殺後第22図に示す精巣、精巣上体、精管、精管膨大部、精のう、前立腺、尿道球腺および尿道を剔出採取し、初めに既述の手術による尿道球腺の剔除が完全に行いうるか否かを検索した。ついで各臓器につき組織標本作製した。前者については尿道球腺が尿道壁の組織内に移行しているか否かを解剖学的に並に組織学的にもしらべた。後者の組織標本についてはホルマリン固定でHx-

Eosin染色の

ほか凝固酵素の

組織化学的検出

を目的としたも

のが作られた。

後者は高松、都

甲氏のレシチナ

ーゼ検出法⁽⁶⁵⁾

⁽⁶⁶⁾を参照して

次のように行つ

た。原理は凝固

酵素作用によつ

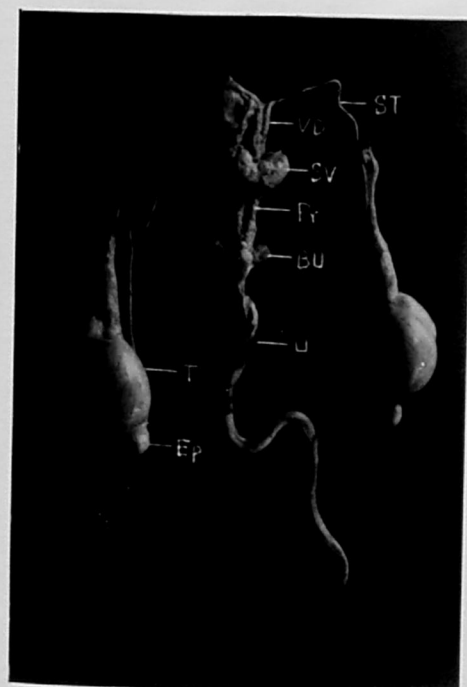
て遊離される脂

肪酸を硝酸銅と

硫化ソーダで発

色させることで

ある。(1)新鮮組



第22図 山羊生殖器道の供試臓器

T : 精巣

Ep : 精巣上体

ST : 精管

VD : 精管膨大部

SV : 精のう

Pr : 前立腺

BU : 尿道球腺

U : 尿道

織を氷冷アセトンアルコール(1:1)で24時間固定,(2)固定組織から凍結切片(約15 μ)を作製,(3)切片を5%卵黄粉3%クエン酸ソーダ緩衝液(pH 6.0)に投入し,12時間40℃で反応,(4)切片を洗滌後0.5%硝酸銅液に5分間浸漬して脂肪酸銅を形成,(5)切片を洗滌後0.5%硫化ソーダ液中に1~2分間浸漬して硫化銅(赤褐色)を形成,(6)充分水洗してヘマトキシリンで核染色,(7)脱水封入 なお以上のほか各臓器につき前節で行ったと同じ方法で酵素活性度も測定した。

Ⅱ. 実験成績ならびに考察

剔除臓器について抽出液の凝固酵素活性度を測定したが,尿道球腺にのみ強い活性度がみとめられ,他の臓器では全く認められなかった。

1. 尿道球腺の剖検

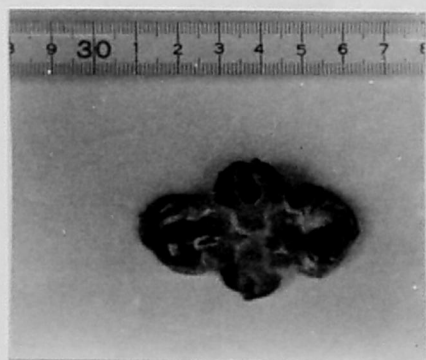
尿道球腺の所在を剖検してみると第23図に示すように尿道壁深く腺体が陥入し,この部分が剔除の際にとり残されることが容易に想像された。また陥入部の組織にも遊離部分と同じ腺細胞がよく発達しており,(第24図),この部分の細胞も後述のごとく組織化学的検査の結果酵素活性のあることが実証された(第25図)。

2. 生殖器道臓器組織における凝固酵素の組織

化学的所見

2頭の山羊いずれにおいても凝固酵素は尿道球腺組織にのみみとめられ(第23図),その他の臓器では検出されなかった。なお染色操作中,硫化ソーダによつて組織がかなり損傷をうけ腺体内での所在は不明瞭であつたが,腺腔よりもむしろ腺細胞内に顕著に検出され,この酵素は腺細胞内ですでに活性状態にあることが推察された。

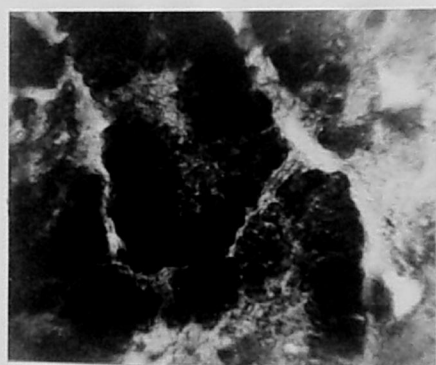
以上第3節と第4節の結果から凝固酵素の分泌臓器は尿道球腺に限られ,前節でのべた剔除後に精液中に酵素活性の残存したのは尿道球腺組織の残存によるもので他の臓器に原因するものではないことが確められた。



第23図 尿道球腺と尿道の断面図



第24図 尿道球腺基部の組織像



第25図 尿道球腺基部組織での
酵素の検出



第26図 尿道球腺組織における
凝固酵素の分布(黒染部)

第5節 摘 要

本節では山羊精液中に存在する卵黄凝固酵素を生産する臓器の検索を行い、また該臓器中の酵素の有無を組織化学的に検討した。

1. 各種生殖器官臓器の抽出液について凝固酵素活性度を測定した結果、尿道球腺の抽出液以外の他の生殖器官臓器の抽出液では検出されなかった。

2. 2頭の山羊について尿道球腺を剔除し、剔除の前後における精液中の酵素活性度を測定したところ、精液の一般性状や果糖、クエン酸濃度などにはほとんど変化はみられないが、酵素活性度のみが約 $\frac{1}{4}$ 程度にまで低下した。しかし完全には消失しなかつた。また剔除尿道球腺の内容液の酵素活性度は著しく高く、精漿の40~60倍に相当した。

3. 尿道球腺の剖検によつて尿道壁深く腺体が陥入しており、しかもこの組織もまた組織化学的な方法で細胞内にも酵素が検出された。このことから普通の外科的な剔除術によつても精液中の凝固酵素の完全除去の困難なことが推察された。

4. 凝固酵素の組織化学的な検索の結果、尿道球腺組織にのみ酵素が検出され、他の臓器組織では検出されなかつた。

第7章 卵黄凝固酵素の精製

第1節 緒言

一般に酵素の本体とか性質を究明する上に、そのものをできるだけ純粋な型でとり出すことはきわめて重要なことである。第8章にのべるごとく山羊精漿中に存在する卵黄凝固要因は、フオスオリパーゼに属する一種の酵素であることが明らかにされたが、この実験では手はじめに塩析、分別吸着法ならびにアセトン沈澱法によつてこの酵素の精製を試みた。

第2節 塩析法による精製

後述の分別吸着法による精製に先立つて、一般に酵素の精製に広く用いられている硫酸による塩析法⁶⁷⁾をこころみ、この方法による精製の可否について検討した。

I. 実験の材料および方法

1. 精製用の試料：精製の出発材料に使用した山羊精液は、すべて3頭の山羊から人工法で採取し、氷冷下で遠心分離し、精漿を遠心沈澱管に貯溜して、採取後30分以内に使用したものである。

2. 蛋白濃度の測定：出発材料としての精漿ならびに精製の各段階における分割を適当に稀释し、銅-FOLIN比色法²⁸⁾によつて定量し、アルブミン当量で示した。

3. 凝固酵素活性度の測定法：精製の出発材料としての精漿ならびに精製過程の各分割0.1 ml に20%卵清液1 ml を加えて40℃に12時間浸漬し、脂肪酸量を第3章第2節に述べた方法で測定し、上記の蛋白量から蛋白1mg当りの活性度すなわち比活性度⁶⁸⁾をもとめた。

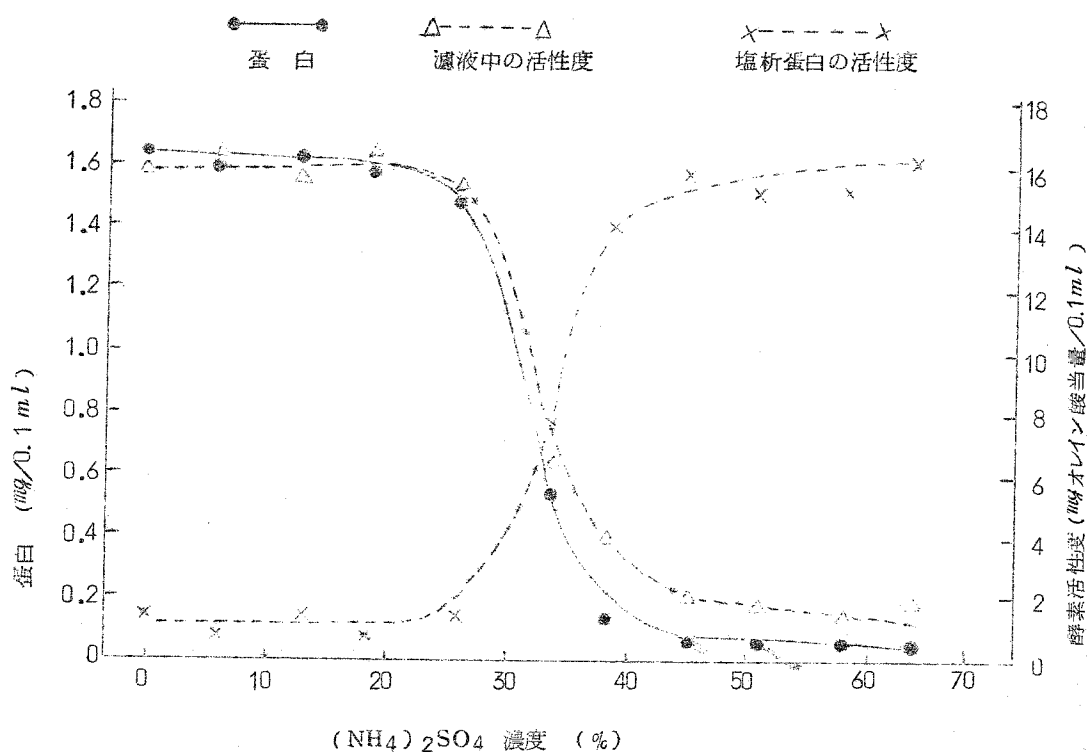
II. 実験成績ならびに考察

出発材料としての精子を完全に除いた山羊精漿2 ml づつを10本の遠沈管に分け、各々に第27図に示すような種々の段階になるように飽和の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を添加し、4℃に2時間静置してそれぞれ塩析沈澱する蛋白を識別した。ついで塩析蛋白を1 ml の蒸溜水に溶解して、濾液と塩析蛋白溶液をそれぞれ4℃で12時間蒸溜水に対して透析したのち蛋白量と酵素活性度を測定した。実験の結果は第27図に示される。

すなわち硫酸濃度26%附近で蛋白が沈澱しはじめて35%程度になるとほとんど全蛋白が沈澱した。一方濾液中の凝固酵素活性度も蛋白濃度と平行して低下した。また塩析蛋白溶液中の

活性度と蛋白濃度は濾液中のそれとは全く逆に硫酸濃度の高くなるにつれて上昇した。

以上のごとく山羊の精漿蛋白は硫酸濃度を徐々に高めても分別的に沈澱せず、26 %程度でほとんどの蛋白が急激に沈澱し、この方法による精漿蛋白の分別は困難であると思われる。



第27図 精漿蛋白の塩析曲線

ついで急激に沈澱の生ずる硫酸濃度26 %から35 %の間を詳細に検討するために25.0 % , 27.0 % , 30.9 % , 33.2 % , 35.0 %の硫酸濃度区を作つて分別沈澱を試みたが、とくに純度の高い分割はえられなかつた。このように硫酸塩析による分別の困難なことは、後述第29図の山羊精漿の電気泳動図に示されるように山羊精漿の蛋白分割が電気泳動によつても分離し難い性質とも関連があるのではないと思われる。

第3節 磷酸カルシウムゲルを使用する分別吸着法⁶⁹⁾による精製

I. 実験の材料および方法

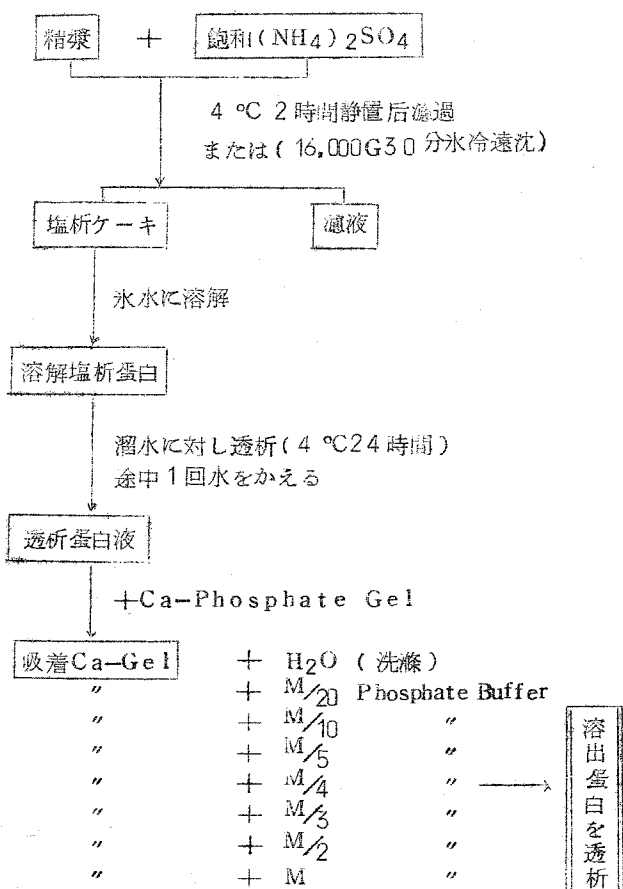
精製用の試料の調整、蛋白量ならびに酵素活性度の測定法は前節と同様である。なお分別後

の蛋白分割についての濾紙電気泳動法による検討は小林の方法³⁷⁾に準じてつぎのようにして行つた。すなわち分割した試料を少量の水に溶解し、蛋白濃度を約5%に調整して試料溶液とした。ついで東洋濾紙No.51(13×26cm)をペロナル緩衝液に浸し、試料溶液0.05mlを濾紙上に線状につけ、10~13V/cm, 0.5~0.6mA/cmで4時間室温で泳動させ、濾紙を110℃で20分間乾燥後アミドシュバルツ10Bで20分染色し、2%氷醋酸で数回洗滌後乾燥し、パラフィンで透明にして小林式濾紙光電光度計で分割濃度を測定した。

II. 実験成績ならびに考察

上述のごとく硫酸による塩析では酵素蛋白の分別が困難であり、ついで吸着法による分別を試みた。その概要は第23表に示すごとくである。まず精漿蛋白の濃縮の意味で精漿に等量の飽和硫酸溶液を加えて精漿蛋白のほとんど全量を沈澱させ塩析蛋白に少量の溜水を加えて溶解して透析し、これを燐酸カルシウムゲル^{70),71)}に完全に吸着させて水洗し、これに表示の

第23表 精製過程



とき各濃度の燐酸緩衝液 (pH 7.0) を加えて各々10分間4℃で溶出させて遠沈し、上澄の蛋白分割の溶出液を一夜透析したのち、各分割について蛋白濃度と酵素活性度を測定した。実験の結果を示すと第24表の通りである。凝固酵素活性度は脂肪酸量で示した。なお精製の程度を論ずる際に最も問題になる比活性度は、蛋白量1mg当りの活性度としてもとめた。

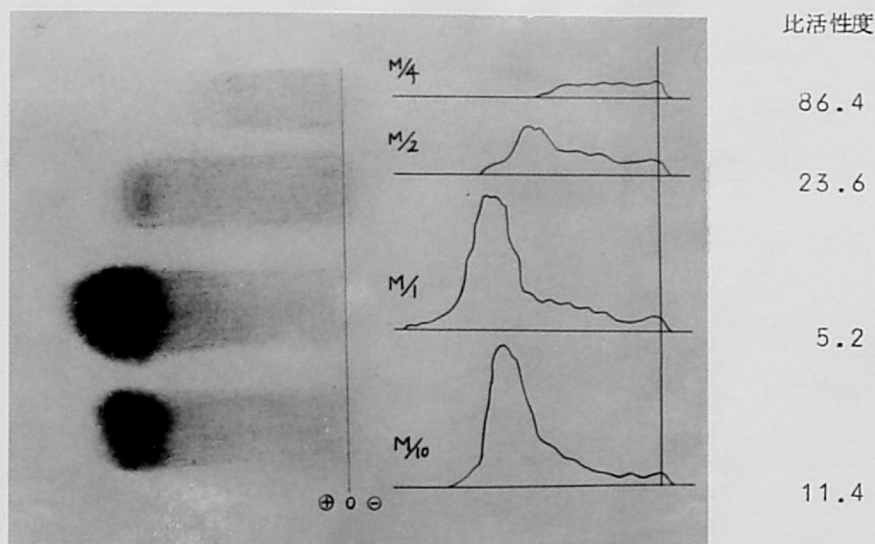
第24表 磷酸カルシウムゲル分別吸着法による凝固酵素の精製

(5例平均)

分 割	活性度/ 0.1ml 分割	蛋 白 (mg/0.1ml 分割)	比活性度 (mg/mg 蛋白)
	(脂肪酸mg)		(脂肪酸mg)
精 漿	31.0	2.49	12.4
塩析蛋白溶液	33.1	6.06	5.5
透析蛋白溶液	22.2	3.03	7.3
吸着後の上澄液	0	0.05	0
溶出に使 用した磷 酸緩衝液 の濃度	M/20	0.33	11.2
	M/10	0.37	11.1
	M/5	0.10	25.0
	M/4	0.11	165.5
	M/3	0.24	22.1
	M/2	0.50	24.6
	M/1	1.35	5.8

これによると塩析、透析の操作では前節でものべたように挾雜蛋白も共沈し、むしろ比活性度は精漿の12.4に対し7.3に低下した。すなわち塩析ならびに透析の操作では純度は上昇せず、むしろ酵素自体幾分損傷をうけることが推定される。つぎに磷酸カルシウムゲルに吸着後、遠沈した上澄液では蛋白量、酵素活性ともにほとんど認められず、酵素蛋白もふくめたほとんど全蛋白がほぼ完全にカルシウムゲルに吸着されたものと思われる。つぎにこの蛋白吸着カルシウムゲルに各濃度の磷酸緩衝液を加えて溶出させたところ、M/4溶出分割では蛋白量が少いが、活性度が高く、したがって比活性度は他の分割よりもはるかに高かった。逆にM、M/10、M/20溶出分割では、蛋白量の割に活性度は低く、これらの分割の酵素純度は低かった。したがってこの方法でM/4溶出分割を透析することによつて、かなり高純度の凝固酵素を分別しうるものと思われる。なおM/4溶出分割の比活性度は精製の出発材料としての精漿の約13倍程度であつた。

つぎに分別分割のうち、比活性度の最も高いM/4溶出分割、比較的高いM/2溶出分割、もつとも低いM/1溶出分割、比較的低いM/10分割について蛋白の濾紙電気泳動をこころみ



第28図 分別吸着法による分割の濾紙電気泳動像

た。その結果第28図に示すごとく比活性度の高い $M/4$ 分割では泳動速度の遅い蛋白がほとんど大部分を占め、逆に比活性度の低い M 分割では、泳動速度の速い蛋白で占められていた。このことから酵素蛋白の泳動速度の遅いことが推定される。

第4節 アセトン分別沈澱法⁷²⁾による精製

上記の精製法について低温下でのアセトン分割法を試みた。

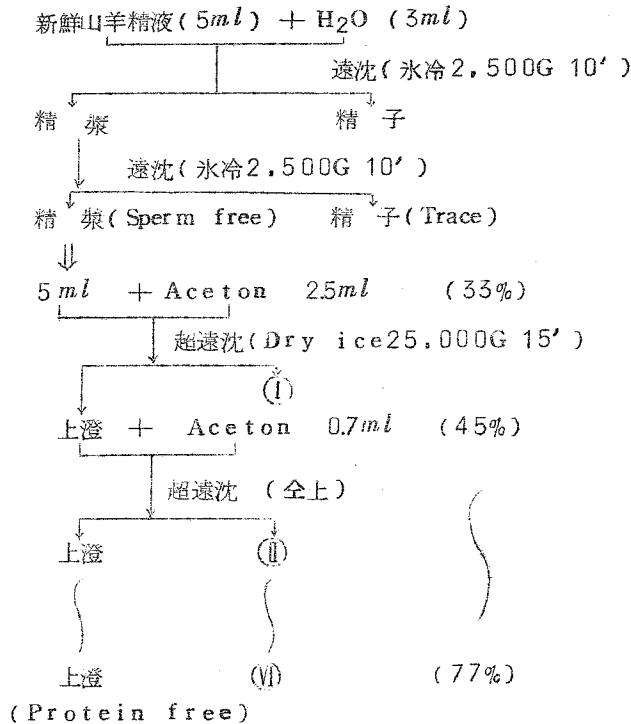
I. 実験の材料および方法

精製用の試料の調製、蛋白濃度および酵素活性度の測定ならびに濾紙電気泳動法は前節と同様に行つた。

II. 実験成績ならびに考察

精製過程の概要を第25表に示したが、まず精製の出発材料として精製に氷冷下で段階的にアセトンを加えて第25表および第26表に示されるようにアセトン濃度を33%から77%まで6段階にとり、各々のアセトン濃度で沈澱する蛋白をそれぞれ25,000G 15分間超遠沈してえられた分割を1~2mlの溜水に溶解して各々について蛋白濃度と酵素活性度を測定した。

第25表 精製過程



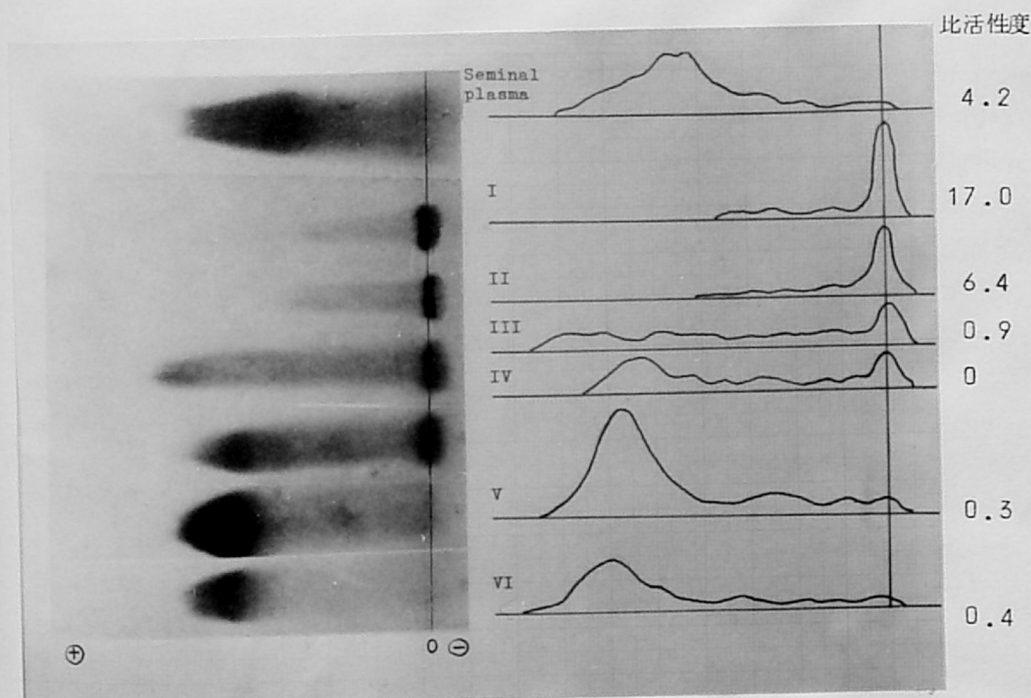
えられた結果は第26表に示すごとくになり、凝固酵素活性度はアセトン濃度33%で沈澱してくる分割が最も高く、精漿、分割Ⅱがこれについている。なお分画Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ、Ⅵの活性度はきわめて低い。一方蛋白量は分割Ⅴ、精漿、分割Ⅱの順に高く、したがって純度は分割Ⅰが最も高く、ついで分割Ⅱ、精漿となり分割Ⅲ以下の純度はきわめて低い。以上のごとくアセトン分割法によつて比較的簡単に酵素の純度を上げることができるが、表示のように精漿の比活性度4.34に対して分割Ⅰのそれは15.71であつて、純度は約3.5倍程度にしか上昇していない。これは比較的溫度には安定と思われた本酵素についても、やはり塩析、分別吸着法などの場合と異り、アセトンの使用によつて酵素がかなり損傷をうけるのではないかと思われ、アセトンの害作用を防ぐ意味でも超速沈中の溫度をさらに低く保つ必要があると思われる。ちなみに今回の実験の場合ローター上をドライアイスで掩つたが、遠沈終了時の溫度は8℃に上昇していた。

つぎにここに得られた蛋白分割について純度とか酵素含有分割の泳動性を検討する目的で、各分割溶液を濾紙上に電気泳動させてみた。

第26表 アセトン沈澱法による凝固酵素の精製

(4例平均)

分 割	アセトン 濃度 (%)	酵素活性度 ($\mu\text{g}/0.1\text{ml}$ 分割)	蛋 白 ($\mu\text{g}/0.1\text{ml}$ 分割)	比活性度 ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$ 蛋白)
精 漿	0	19.51	4.495	4.34
I	33	21.97	1.399	15.71
II	45	14.55	2.696	5.40
III	51	2.17	1.364	1.59
IV	62	0.68	1.574	0.43
V	67	1.34	3.202	0.42
VI	77	1.96	0.918	2.14



第29図 アセトン沈澱法による分割の画紙電気泳動像

その結果は第29図に示すごとくで、山羊精漿の泳動図は山羊の血清などかなり趣きを異にし、やや分離が悪く、大体大きな山が2〜3個認められるにすぎない。この精漿を上のごと

き方法でアセトンで6分割に分け、それぞれの泳動図をみると大きな山の全くない分割Ⅰ、Ⅱとこれらとは逆に易動性の山を持つた分割Ⅳ、Ⅴ、Ⅵに大別される。なお泳動させた各分割溶液について比活性度を求めた結果を図中に付記したが、これによると既述の分別吸着法による精製蛋白の泳動像(第28図)の場合と同様の傾向を示し、易動性の大きな山をもつた分割の比活性度はきわめて低かつた。

泳動図(第29図)に示された分割Ⅴ、Ⅵの易動性の大きな山はほとんど凝固酵素とは無関係の蛋白分割と考えられ、アセトン分割法によつて分割Ⅰ、Ⅱの酵素純度の上昇するのは主としてこの分割Ⅴ、Ⅵの蛋白が精漿から分別されるためと思われる。なおこれらの分割は第4章第4節で電気射精液精製蛋白の濾紙電気泳動の結果と比較検討することによつて、精漿構成蛋白のうち精のう由来の蛋白分割と推定された。ただし酵素活性をもつ部分が分割Ⅰ、Ⅱの泳動図で深く原点にとどまる部分か、または難動性のうすく流れている部分に由来するものかは不明である。

第5節 摘 要

山羊精液中の卵黄凝固酵素について、その本体とか性質を究明する上に、酵素をできるだけ純粋な型でとり出すことはきわめて重要であり、とくに本酵素作用のごとく新たに知られたものについては精製の意義は大きいと思われる。この実験では塩析、分別吸着法ならびにアセトン分割法などによる精製を試みた。主なる結果はつぎのごとくである。

1. 精漿に対して硫酸塩析法による分別沈澱を試みたが、硫酸濃度30%前後で全蛋白分割が同時に沈澱し、この方法による酵素の分別は困難であつた。

2. 精漿を塩析、透析後磷酸カルシウムゲルに吸着させ、これを種々の濃度の磷酸緩衝液で分別溶出させることによつて、 $M/4$ 磷酸緩衝液溶出分割の酵素純度がかなり高いことが知られ、精漿に比して純度約13倍の分割がえられた。

3. 精漿に対してアセトン分割法による精製を試み、アセトン濃度33%で沈澱する分割の酵素純度が高く、精漿の約3.5倍程度に純度を上げることができた。

4. 磷酸カルシウムゲル分別法による分割およびアセトン沈澱法による分割を濾紙上に電気泳動させて分別分割の実態をたしかめたが、両者とも純度の高い分割の移動度が低く、ほとんど酵素を含まない蛋白分割の移動度の高いことが知られた。後者はおそらく精のう由来の蛋白と思われる。

第8章 凝固酵素の卵黄に対する作用位置と 酵素の種類の推定

第1節 緒言

凝固に際し凝固酵素が卵黄のいずれの成分に作用するか、また遊離される物質は何かなどを
知ることは酵素の属する種類を決める上に重要なことであり、同時にこれを明らかにすること
により凝固防止の方法に関する知見をもうることになると考えられる。これらの観点からこの
実験では凝固前後の卵黄の化学的变化を追究した。なお本章の実験を通じて使用された酵素と
しての精漿には磷脂質がふくまれ、このもの自身も酵素の作用を受けるが、反応生産物はきわ
めて微量で結果の検討には全く影響をあたえないことが知られたので無視した。

第2節 凝固にともなう卵黄の化学的变化

第1章でのべたように凝固にともなつて稀釈精液の pH がかなり低下する。これまで経験的
にかかる凝固現象は山羊精子の解糖によつて生ずる乳酸の蓄積による酸凝固であろうと想像さ
れたこともあつた。そこで手はじめに凝固現象と乳酸蓄積との関連性の有無をしらべた。また
 pH の低下することから考えて卵黄中に多量に含まれる磷蛋白や脂質にもとづく磷酸、脂肪酸な
ど乳酸以外の酸の遊離されることも想像されたので、本実験ではこれらの酸の遊離生成の有無
も追究した。

I 実験の材料および方法

1. 凝固時の pH の低下と乳酸生成の有無：

卵ク液にそれぞれ山羊精液、山羊精漿、2回洗滌山羊精子を加えたものを 4°C に保存し、
その後6日間にわたりこれらの混合液各々の pH 、葡萄糖量と乳酸量を測定した。 pH はガラ
ス電極 pH メーターにより測定し、葡萄糖は NELSON-SOMOGJI⁷³⁾の方法および
FOLIN-MALMROS⁷⁴⁾の方法、乳酸は BARKER-SUMMERSON³⁶⁾法により定量した。

2. 凝固にともなう卵黄中の磷蛋白の変化

a) 凝固にともなう卵黄分劃磷变化: 試料混合液は、精漿 0.2ml に 20% 卵ク液
(pH 6.0) 2ml を加えたもので、これを 40°C に12時間浸漬し、凝固前後の劃分磷量
を GOMORI の方法⁴⁸⁾で比色定量した。この際対照として精漿のかわりに蒸留水を加えた
試料についても同様に処理し定量した。なお劃分磷の劃分は SCHNEIDER 法⁴⁷⁾により行

つた。

b) 凝固酵素の種類と解糖作用： 凝固酵素として精漿と尿道球腺抽出液を使用し、精漿は0.2 ml を、抽出液は0.1 ml をいずれも2 ml の20%卵黄液 ($\text{PH } 6.0$) に加えて40 °Cに12時間浸漬し、混合試料液について凝固の前後における酸溶性磷と脂質磷を定量した。

3. 凝固前後の混合液中の脂肪酸量および中性油脂量

脂肪酸ならびに中性油脂の定量は第3章第2節の方法に準じて行つた。なお中性油脂量は脂肪酸の滴定前の乾潤の状態で重量法によつて測定した。

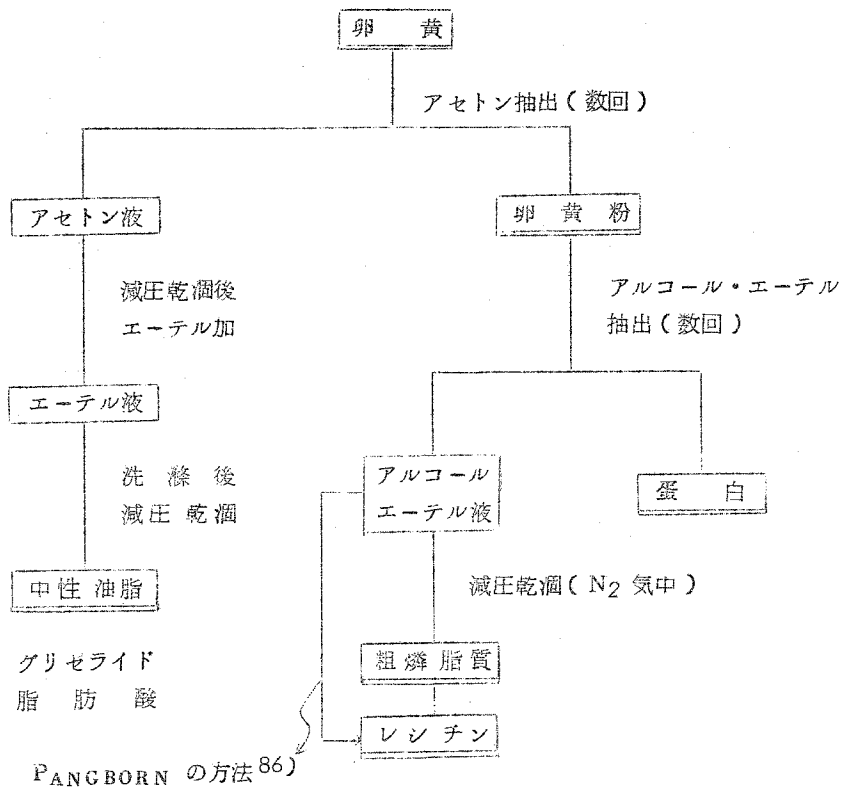
4. 卵黄の超遠心分割に対する凝固酵素作用

卵黄清と卵黄顆粒の分割は SCHMIDT et al.,⁷⁵⁾ 長谷川⁷⁶⁾ の方法に準じてつぎのように行つた。すなわち新鮮卵黄を稀釈せずに Spinco Ultracentrifuge Model L (Rotor No. 30) を用いて80,000 G 4時間遠心分離し、黄色透明な卵黄清と淡黄色に沈殿する卵黄顆粒をえた。卵黄顆粒は0.025 M NaHCO_3 を含む0.13 M KCl 溶液中に分散させ、遠心分離して集めて洗滌卵黄顆粒とした。精漿と卵黄分割との混合割合は、全卵黄は20%，卵黄清は16.4%，卵黄顆粒は3.6%の割合にいずれもクエン酸緩衝液に溶解し、約1N HCl で PH を6.0に調整し、それぞれ2 ml に精漿0.2 ml を加えた。これらの混合液を40 °Cに12時間浸漬し、凝固の前後に3と同様の方法でそれぞれの脂肪酸量を定量した。なお上記の卵黄清と卵黄顆粒の濃度は各分割の全卵黄に対する乾物重の割合（長谷川⁷⁶⁾）に準じて決定した。

5. 有機溶媒による卵黄分割に対する凝固作用：

供試分割は卵黄中性油脂、卵黄粉、卵黄蛋白、卵黄粗磷脂質、卵黄レシチンであつて、これらの分割は第27表に示すような方法で行つた。混合液の内容は、全卵黄は20%クエン酸緩衝液として5 ml，卵黄蛋白、卵黄粉、中性油脂、卵黄粗磷脂質はいずれも1 gを5 ml のクエン酸緩衝液に懸濁させ、レシチンは300 mg を2 ml のクエン酸緩衝液に懸濁させ、レシチン懸濁液には0.1 ml の精漿を、その他の分割溶液には0.5 ml の精漿を加え、いずれも40 °Cに12時間浸漬して浸漬の前後における脂肪酸量を3と同様の方法で測定した。またいずれの分割の場合にも対照として精漿のかわりに蒸留水を加えた混合液を作り、同様に処理し定量した。なおレシチンは試料が少く、反応後の脂肪酸量も少く、滴定法による測定が困難であつたのでアセール基の消失量⁷⁷⁾を測定して酵素作用の有無すなわち脂肪酸遊離の有無を検討した。アセール基の定量には、レシチン懸濁液と精漿との混合液から SCHMIDT et al.,⁷⁸⁾

第 27 表 卵黄分割の操作

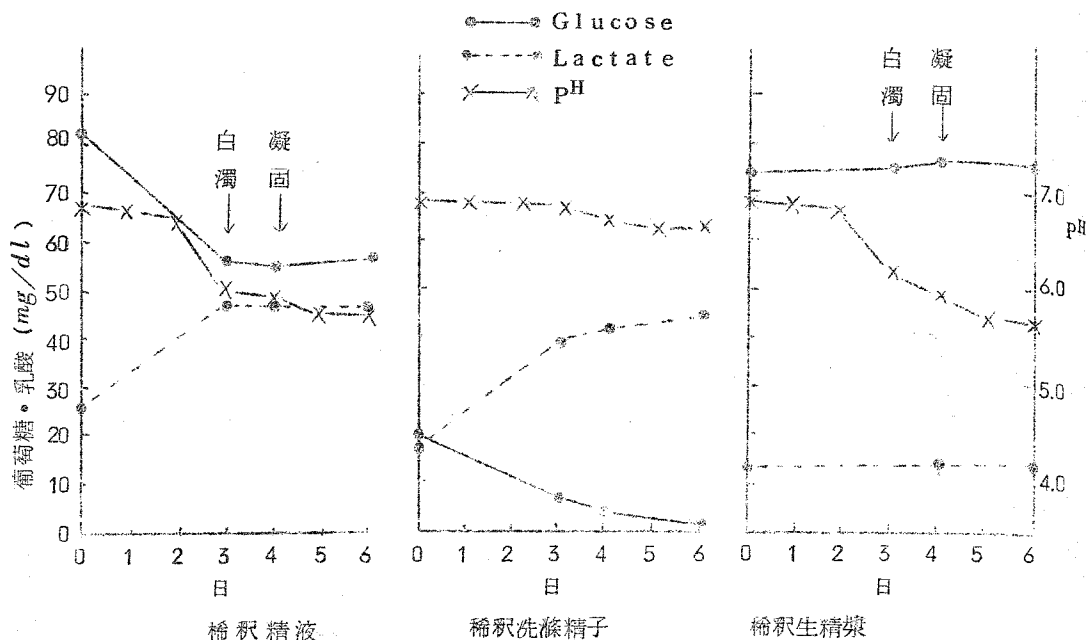


SCHNEIDER⁷⁹⁾, BLOOR⁸⁰⁾, FEULGEN et al⁸¹⁾, CHRISTL(1953)の方法⁸²⁾により Isopropanol で抽出し, STERN AND SHAPIROの方法⁸³⁾により比色定量した。

II 実験成績ならびに考察

1. 凝固時の P^H の低下と乳酸生成の有無

精液+卵ク液, 洗滌精子+卵ク液, 精漿+卵ク液における保存中の P^H , 葡萄糖量, 乳酸量を図示すると第30図のごとくである。精液+卵ク液では P^H は白濁時に急激に低下し, また白濁するまでは糖量が低下して乳酸量は増加した。このことからみるとあるいは P^H が白濁時に6.0前後にまで低下し, これは糖の消費と乳酸の蓄積に関連があるように考えられる。しかし洗滌精子+卵ク液では白濁, 凝固がないにかかわらず, 乳酸量は精液+卵ク液におけると同程度まで増加している。また P^H 低下の様相を精液+卵ク液と比較すると, 精液+卵ク液では



第30図 凝固作用と乳酸形成との関連性の有無

急激な低下がみられるに反して洗滌精子の場合はきわめて徐々に低下し低下の程度も6.5前後までであつた。すなわち生産された乳酸による P^H の低下と白濁、凝固にともなう P^H の低下とはその様相ならびに程度を全く異にする。なお生精漿+卵ク液では精液+卵ク液と同様に白濁凝固し、 P^H が6.0に低下しているにもかかわらず糖と乳酸量はともに変化せず、また精液+卵ク液にくらべて乳酸濃度もはるかに低いことを示している。以上の実験から白濁凝固は P^H の低下をとともなうが、必ずしも解糖や乳酸の蓄積を必要としないことが知られ、乳酸以外の酸の遊離を起させることが想像された。

2. 凝固にともなう卵黄中の磷蛋白の変化

この実験は凝固時に卵黄磷蛋白中の磷酸が遊離されるか否か、また遊離されるとすればいずれの磷分割が凝固酵素の作用をうけるか、さらに使用する凝固酵素の種類(精漿、尿道球腺分泌液)によつて作用に差があるか否かなどを検討するために行われた。

a) 凝固にともなう卵黄分割磷の変動

予備実験として凝固前後における酸溶性磷を定量した結果、反応液を浸漬後6時間で徐々に酸溶性磷の量が増加し、12, 24時間後にはかなりの量に達することが知られた。つきにこ

これらの磷がいずれの磷分割に由来するものかを検討するために、凝固の前後に卵黄を酸溶性、脂質、核酸、蛋白の各分割にわけてそれぞれの磷量を測定した。その結果第28表に示すように核酸磷と蛋白磷は凝固の前後でほとんど変化がなく、脂質磷が減少して酸溶性磷の増加する

第28表 凝固の前後における混合液中の分割磷の濃度(8例平均)

分割磷 (mg/dl)	20%卵ク液2ml+精漿0.2ml			20%卵ク液2ml+H ₂ O 0.2ml(対照)		
	開始時	12時間後	差	開始時	12時間後	差
酸溶性磷	6.2±1.49	20.6±5.43	+14.4	4.8±0.40	4.9±0.51	0.1
脂質磷	87.7±8.58	70.2±13.02	-17.5	83.5±8.13	85.2±7.82	1.7
核酸磷	3.7±0.93	4.1±0.66	0.4	3.3±0.41	3.5±0.66	0.2
蛋白磷	18.8±3.06	17.6±4.57	1.2	16.8±2.07	18.5±3.37	1.7
総磷	123.9±4.81	119.7±8.44	4.2	108.5±9.45	112.1±9.60	3.6

ことが知られ、脂質磷の磷が1部遊離することが知られた。なお対照として蒸留水を加えた区では浸漬の前後で各分割磷量に変動がみられなかった。

b) 凝固酵素の種類と磷酸の遊離

上述のように凝固酵素として精漿を用いた場合には磷脂質からの磷酸の遊離がみられたが、この実験では凝固要因として尿道球腺抽出液を使用した場合の磷酸遊離の有無を検討した。その結果は第29表に示すように尿道球腺抽出液の場合は磷分割にほとんど変化はなかった。なお対照として精漿を混合すると前項同様に酸溶性磷、脂質磷に増減がみられ、また凝固酵素のかわりに蒸留水を加えた区では磷酸の変動はみられなかった。以上の実験結果から磷酸の遊離は凝固現象とは直接関係のないこと、およびこの凝固酵素自体には磷酸を遊離する作用はなく、

第29表 凝固酵素の種類と解磷作用の有無(4例平均)

凝固酵素	分割磷 (mg/dl)	20%卵ク液+凝固酵素			20%卵ク液+H ₂ O(対照)		
		開始時	12時間後	差	開始時	12時間後	差
精 漿	酸溶性磷	6.1±0.7	21.7±3.7	+15.1	5.3±0.4	5.2±0.3	0.1
	脂質磷	70.1±2.5	54.0±1.4	-16.1	67.8±2.7	69.4±2.0	1.6
尿道球腺 抽出液	酸溶性磷	7.4±1.7	8.5±1.9	1.1	5.2±0.4	5.3±0.4	0.1
	脂質磷	66.1±3.3	66.7±4.1	0.6	66.2±5.9	67.4±4.5	1.2

解磷現象は精漿中に混在する他の要因に起因するのではないかと思われるに至つた。

3. 凝固にともなう卵黄中の遊離脂肪酸量の変動

凝固の前後における遊離脂肪酸量の変動を測定した結果、第30表に示すように凝固させたものでは著しい脂肪酸の増加が認められ、これに対し凝固酵素の代りに蒸留水を加えた区では脂肪酸の生成はみとめられなかつた。なお脂肪酸の増量は凝固酵素として用いられた精漿、尿道球腺抽出液のいずれの場合にも同様にみとめられ、とくに尿道球腺液と卵ク液を混合した場合に脂肪酸の遊離の程度が著しかつた。また表示のように中性油脂量が測定されたが、これは本実験の抽出法では脂肪酸が遊離してくると中性油脂区分に入ってくるために中性油脂量が増加することが予想され、そのために滴定法による脂肪酸の測定に対する裏付けの意味で実施さ

第30表 凝固前後における混合液中の脂肪酸および中性油脂量の変動(7例平均)

	20%卵ク液 10 ml + 精漿 1 ml			20%卵ク液 10 ml + H ₂ O 1 ml (対照)		
	開始時	12時間後	差	開始時	12時間後	差
脂肪酸量 (mg/g 卵黄)	3.8 ± 0.77	101.1 ± 27.74	+97.3	2.6 ± 0.50	2.5 ± 0.54	0.1
中性油脂量 (mg/g 卵黄)	130.2 ± 5.35	176.7 ± 48.68	+46.4	148.0 ± 14.41	143.0 ± 14.86	5.0

れたものである。実験の結果対照に比べ凝固させたものでは、変異は大きい、かなり増加しており、やはり遊離した脂肪酸がこの増量に影響したものと思われる。なお変異が大きかつたのは抽出にエーテルを使用したため、水洗の際に水層との分離が不良であつたためと思われる。

4. 卵黄の超速沈分割に対する脂肪酸遊離作用

凝固時に卵黄から脂肪酸が遊離されることが知られたので、本実験は卵黄構成成分のうちいずれの部分が作用をうけるかを検討するために行われた。すなわち既述の方法で卵黄清と卵黄顆粒の両者に分けこれらに対して精漿を加え、脂肪酸遊離の程度を測定した。その結果第31表に示すごとく、全卵黄では前2項と同程度の脂肪酸の増加がみられ、分割では卵黄清に多く、卵黄顆粒では少量であつた。しかしこれら各分割について単位量当りの脂肪酸量を計算すると表示のごとく全卵黄で78.0mg、卵黄清で83.6mg、卵黄顆粒で31.7mgとなり各分割ともかなりの量の脂肪酸を遊離していることが知られた。したがつてこの分割法では脂肪酸の由来する分割を分けることができなかった。

第31表 卵黄の超遠沈分割に対する凝固酵素作用（5例平均）

	20%全卵黄	16.4%卵黄精	3.6%卵黄顆粒
脂肪酸 ($\mu\text{g}/2\text{ml}$ 反応液)	31.2	27.1	2.3
脂肪酸 ($\mu\text{g}/\text{g}$ 分割)	78.0	83.6	31.7

5. 有機溶媒による卵黄分割に対する凝固酵素作用

前項で超遠沈分割法では脂肪酸を遊離する分割を分けえなかつたので、本実験は既述のように主として有機溶媒を用いて分割し、それぞれに対する凝固作用（脂肪酸遊離作用）を測定することによつて脂肪酸を遊離する分割ならびに位置を明らかにしようとして行われた。その結果第32表に示すように脂肪酸の生成は全卵黄，卵黄粉，粗磷脂質を含む反応液においてみられ，その他の分割を含む反応液では認められなかつた。

第32表 有機溶媒による卵黄分割に対する凝固酵素作用*（5例平均）

卵黄分割	開始時	12時間後	差	備考
全卵黄	7.68 \pm 1.20	126.43 \pm 37.52	118.75	増加
卵黄中性油脂	7.21 \pm 2.35	9.15 \pm 3.81	1.94	
卵黄粉	8.36 \pm 1.82	52.14 \pm 6.44	43.78	増加
卵黄粗磷脂質	13.61 \pm 3.15	72.75 \pm 26.63	59.14	増加
卵黄蛋白	5.29 \pm 2.67	7.14 \pm 5.74	1.85	

* 凝固酵素活性度は脂肪酸量 (μg オレイン酸当量/ g 分割) で示された。

なお精製レシチンに対する凝固酵素の作用をレシチン懸濁液中のアシル基の消失量で測定したところ，第33表に示すごとく酵素作用によつてアシル基が有意に ($P < 0.01$) 減少することが知られた。

第33表 精製レシチンに対する凝固酵素の作用（6例平均）

レシチン 300 μg - クエン酸ソーダ 懸濁液 + 尿道球腺抽出液	Acy l 基 μ eq. /100 μg レシチン		
	開始時	12時間後	差**
	64.4 \pm 9.72	46.0 \pm 4.40	18.4

** $P < 0.01$

以上のことから凝固酵素は磷脂質を含む分割に作用することが知られ、卵黄磷脂質中の acyl 基とのエステル結合に作用するフォスホオリパーゼ系の酵素ではないかと思われた。

第3節 遊離脂肪酸とグリセロ磷脂質のペーパークロマトグラフィー

前節でのべたように滴定法による定量で卵黄中の磷脂質が凝固酵素の作用をうけて脂肪酸を遊離することが知られたが、この実験はさらに遊離される脂肪酸の種類を具体的に確認し、それによつてグリセロ磷脂質のいずれの位置のエステル結合がきれるかを推定するために行われた。また既述のごとく凝固時に磷脂は遊離されないことが知られているので、磷脂質から脂肪酸のはなれたいわゆるリゾレシチンの生成されることも容易に想像されたので、コリン脂質に対する特異的な発色法を用いたペーパークロマトグラフィーによつてリゾレシチン生成の有無を検討した。

I 実験の材料および方法

1. 遊離脂肪酸のペーパークロマトグラフィーによる確認

a) 分離物質の調製: 脂肪酸の滴定終了後、すなわち中性油脂類(グリセライド、脂肪酸を含む)に微アルカリ下で水を加え、中性油脂を石油エーテル($b.p. 30 \sim 50^{\circ}C$)で抽出し、水層を塩酸性 $P^H 2.0$ として遊離脂肪酸を石油エーテル抽出し、水洗脱水後減圧濃縮して脂肪酸試料とした。

b) 展開、発色: 展開、発色には2種類の方法を用いたが、第31図では固定相として濾紙+ケロシン、移動相には90%醋酸を使用し、展開乾燥後ローダミンBで発色した(野田, 平山)⁸⁴⁾。また第32図の場合は固定相として濾紙+ケロシン、移動相としてメタノール-醋酸-ケロシン(10:2:1)を使用し、脂肪酸を *p*-Bromophenacyles-ter 2, 4-dinitrophenyl hydrazone 誘導体として、 $30^{\circ}C$ で6時間展開した。⁸⁵⁾

2. コリン含有グリセロ磷脂質のペーパークロマトグラフィー

a) 分離物質の調製: 新鮮卵黄、卵黄粉、粗磷脂質をそれぞれ20%, 10%, 5%の割に3%クエン酸ソーダ液に溶解、懸濁させて $P^H 6.0$ に調整し、このもの2 ml にそれぞれ凝固酵素として尿道球腺抽出液(対照区は蒸溜水)を加えて $40^{\circ}C$ に12時間浸漬したのち、ただちにクロロホルム5 ml を加えて磷脂質を抽出し減圧濃縮して試料とした。また凝固酵素としての尿道球腺抽出液も同様に処理抽出して盲検試料とした。なお標準試料にはレシチンならびにリゾレシチンをそれぞれ PANGBORN⁸⁶⁾, HANAHAN⁸⁷⁾の方法によつて調

製し使用した。

b) 展開, 発色: 固定相にはケイ酸固定濾紙を用い, 試料着点后ジイソブチルケトン-醋酸-水(8:5:1)の溶媒で, 室温で15時間ガラス円筒中で展開し, 風乾後リン^{88), 89), 90), 91), 92)}モリブデン酸-塩化第一スズで発色した(MARINETTI 法)。

II 実験成績ならびに考察

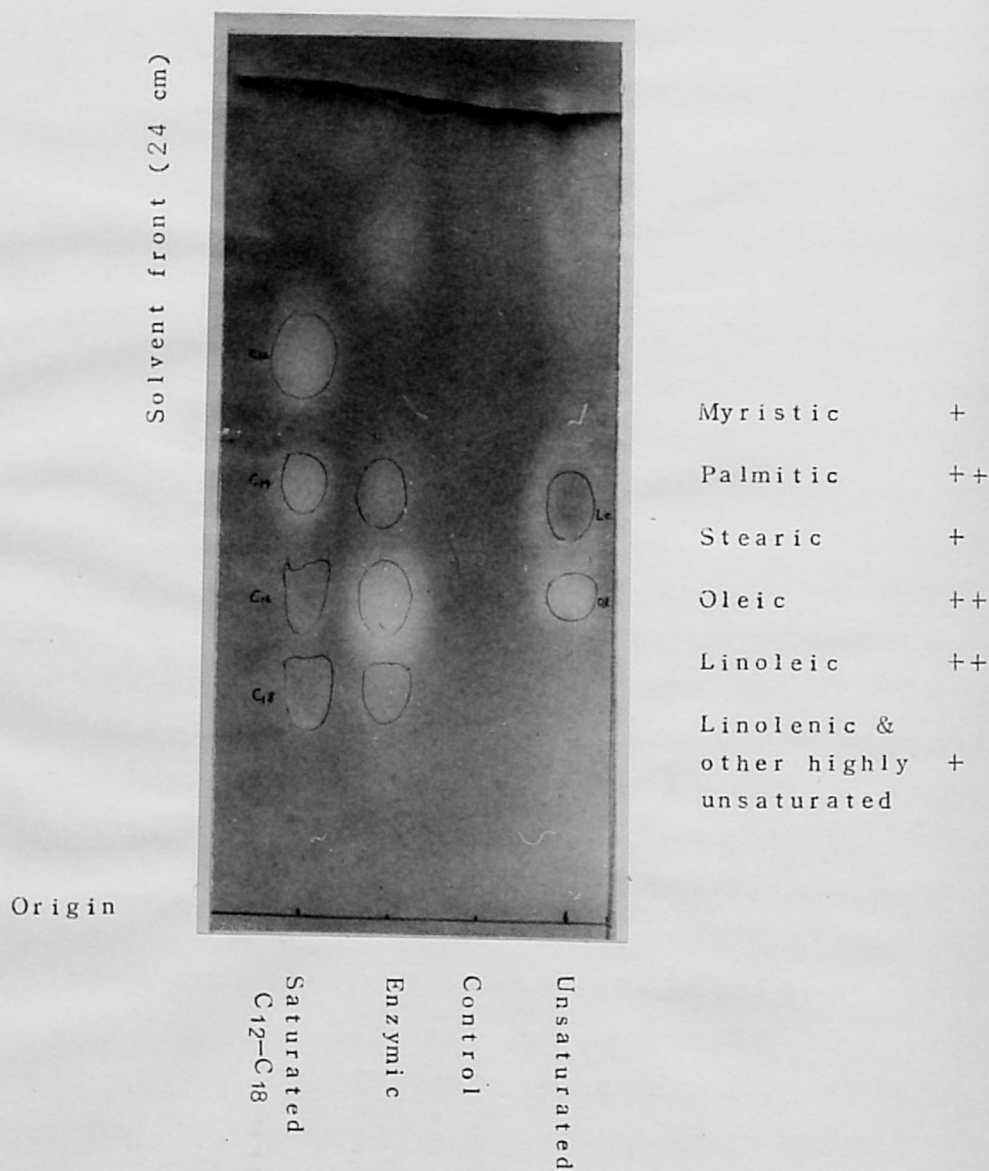
1. ペーパークロマトグラフィーによる遊離脂肪酸の種類の確認

実験結果は第31図に示される。対照として卵黄緩衝液からそのまま抽出した試料からは遊離酸は事実上検出されなかつた。また凝固酵素として尿道球腺抽出液を加えて凝固させたものから抽出した試料では第31, 32図に示すような2種類の展開, 発色法による総合結果から, 飽和酸では主としてパルミチン酸, ステアリン酸, 不飽和酸では主としてオレイン酸, リノール酸などが検出された。これらの事実から滴定法によつて測定された脂肪酸の主なるものは, オレイン酸, リノール酸, パルミチン酸などであることが裏付けられた。なおこのことは蛇毒性のフォスフォリパーゼAが不飽和酸または飽和酸のみを遊離すること⁹³⁾と考え合わせて興味ある問題と思われる。

2. 凝固前後の卵黄磷脂質のペーパークロマトグラフィーによるリゾレシチンの検出

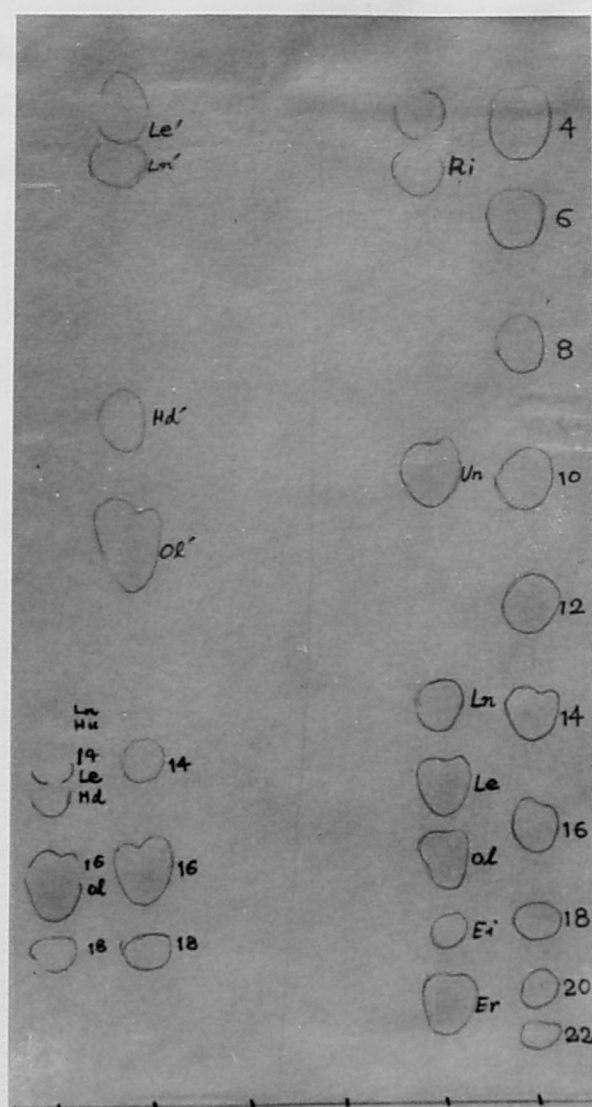
卵黄の磷脂質含有分割に凝固酵素を加えて反応させたものと加えなかつたものについて, コリン脂質に対する特異的な発色法を用いてペーパークロマトグラフィーによつてこれらの動静を検討した。その結果第33図に示すごとく, 凝固酵素を加えたものから抽出した試料ではリゾレシチンが検出され, 凝固酵素を加えない試料では, みとめられなかつた。なお凝固酵素としての尿道球腺抽出液のみから抽出した試料ではレシチン, リゾレシチンともに検出されなかつた。スポットの位置は図示のごとく標品として流したレシチン, リゾレシチンのスポットと対比された。なお卵黄粉からの抽出試料で, 対照区, 凝固酵素添加区ともにレシチンよりも R_f の大きいすいスポットが認められたが, この本体は不明である。

以上によつて一応凝固酵素が卵黄磷脂質に作用して脂肪酸を遊離し, リゾレシチンを生成することがわかり, このことから蛇毒性のものと類似のフォスフォリパーゼA⁹⁴⁾に属する酵素であろうと思われる。ただし蛇毒は磷脂質から不飽和酸または飽和酸のみを遊離する⁹³⁾のに対して本酵素は不飽和酸, 飽和酸の両者を遊離する点で注目すべきものと思われる。



第31図 脂肪酸のペーパークロマトグラム (I)

Solvent front (31 cm)



Saturated;
Myristic +
Palmitic ++
Stearic +

Unsaturated;
Hexadecenoic +
Oleic ++
Linoleic +

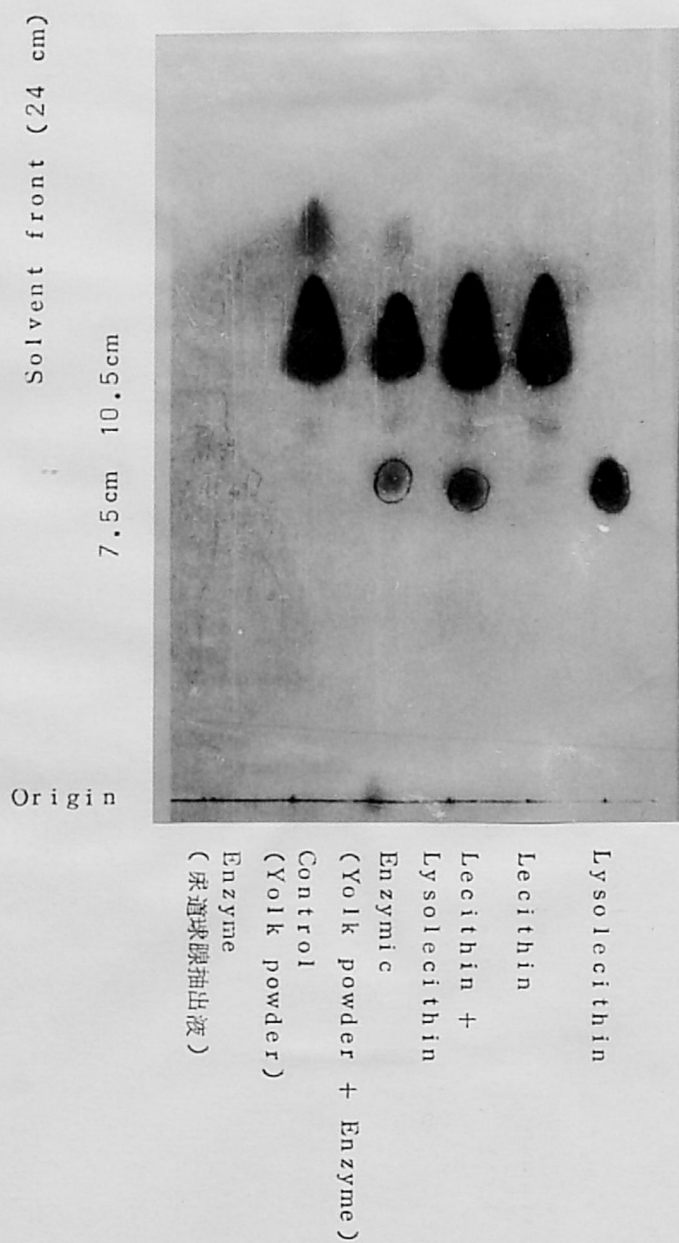
Linolenic &
other highly +
unsaturated

Note;
('); Spot of the
merculated
Ri; Ricinoleic
Un; Undecenoic
Ln; Linolenic
Le; Linoleic
Ol; Oleic
Hd; Hexadecenoic
Ei; Eicosenoic
Er; Erucic
Hu; Highly unsatu-
rated acids

Origin

Saturated
(C₄ ~ C₂₂)
Unsaturated
Control
(Mercurated)
Control
(Nonmercurated)
Enzymic
(Mercurated)
Enzymic
(Nonmercurated)

第32図 脂肪酸のペーパークロマトグラム (II)



第33図 卵黄中のコリン脂質のペーパークロマトグラム

第4節 摘 要

稀釈精液の白濁凝固時には著しい pH の低下がみとめられたので凝固時に遊離される酸の種類や、凝固酵素の卵黄に対する作用位置について検討を加え、大要つぎのような結果がえられた。

1. 乳酸の蓄積は精子を含む場合にのみみられ、卵黄液に精漿を加えて凝固させた場合には乳酸量の増加はなく、凝固と乳酸蓄積との間には直接関係はみられなかつた。

2. 卵黄分割に対する凝固酵素の作用を検討し、卵黄の磷脂質からエステル結合がされて脂肪酸は遊離されるが磷酸結合はされないことが知られた。

3. 凝固した卵黄緩衝液について遊離脂肪酸と磷脂質に関するペーパークロマトグラフィーを実施し、その結果遊離される脂肪酸の主なるものは、オレイン酸、リノール酸、パルミチン酸、ステアリン酸などであること、また磷脂質から脂肪酸が遊離され、リゾレシチンが生成されることが知られた。

4. 以上の結果から凝固酵素は蛇毒性のものと類似のフォスホオリパーゼAに属する酵素と推定された。

第9章 凝固発現の機序と凝固時の精子死滅の原因

第1節 緒言

既述のように山羊精液を卵黄緩衝液で稀釈すると数日後に白濁し、ついて凝固するが、この際の卵黄緩衝液の化学的变化については第8章にのべたように卵黄中のグリセロ磷脂質が凝固酵素の作用をうけて α 位および β 位のエステル結合を解離して脂肪酸を遊離し、リゾレシチンを生成することが知られた。しかしどのような機序で白濁とか凝固のような随伴現象が起るかについては不明であつた。この実験はかかる物理的随伴現象についての実態をたしかめんとし行われたものである。なお白濁や凝固の起る前日までは活発な運動性を示した保存精子が、白濁によつて急激に衰弱し、凝固に至つて全滅することが知られているが、かかる精子死滅の原因についても検討した。

第2節 凝固発現の機序

凝固の前後における卵黄緩衝液を顕微鏡下で観察し、また両者を SUDAN Ⅲ で染色して卵黄油や、脂肪酸の動静を観察し、さらに各種の脂肪酸を卵黄緩衝液に人為的に添加して白濁、凝固の有無なども検討し、凝固発現の実態を明らかにしようとした。

I 実験の材料および方法

1. 卵黄緩衝液の顕微鏡的観察

凝固しない卵黄緩衝液（卵黄 1：3 %クエン酸ソーダ 4）と凝固させたものをそれぞれ白金耳でとり精子活力検査板を使つて鏡検した。また脂肪酸の存在下での卵黄油滴の動静をみるために活力検査板に卵ク液の一滴をのせ、カバーガラスの間隙から微量の脂肪酸（オレイン酸）を毛細管で注入し鏡検した。なお卵黄油滴の観察を容易にするために卵黄緩衝液に等量の SUDAN Ⅲ 染色液を混合して染色した。

2. 卵ク液に対する各種脂肪酸の人為的添加と白濁、凝固の有無

卵ク液 10 ml づつを尖底試験管にとり、これに対して第8章でその種類が明らかにされた脂肪酸（オレイン酸、パルミチン酸、ステアリン酸）をそれぞれ 30 mg/ml づつを加えた区および3者のうち2者 15 mg/ml づつを組合せて添加した区をつくり、よく振とうして 4°C に静置し凝固の有無を検した。

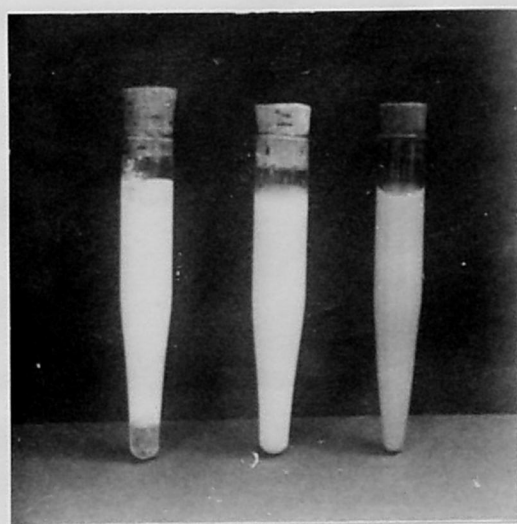
3. 卵黄油と卵黄粉の人為的混合時の凝固の有無

この実験は卵黄緩衝液の凝固に卵黄油の果たす役割を検討するために行われた。卵黄に冷アセトンを加えて卵黄油と、不溶部の卵黄粉とに分割し、後者から10%卵黄粉-3%クエン酸ソーダ液を作り、これに卵黄油を5%の割合になるように加え、一方には対照として溜水1mlを他方には粗酵素液としての精漿1mlを添加して4°Cに保存し凝固の有無を検した。

II 成績ならびに考察

1. 凝固卵黄緩衝液の顕微鏡的観察

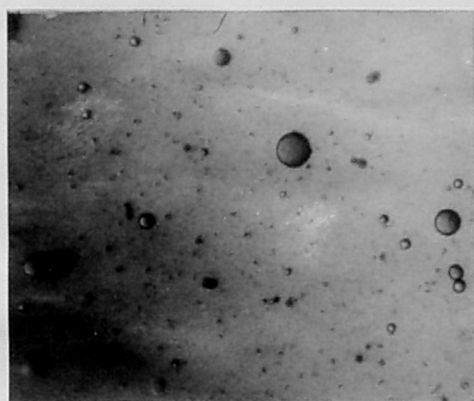
第34図は山羊精液を卵黄緩衝液で10倍稀釈し4°Cに保存した際の白濁、凝固の様相を示したものである。



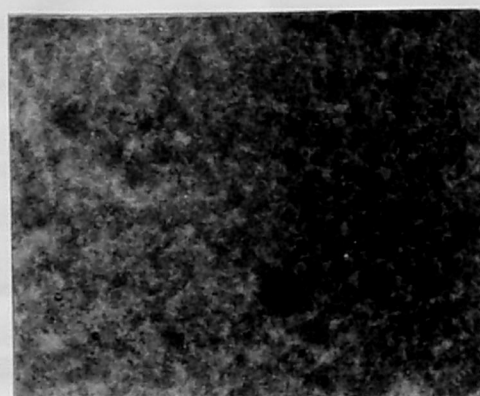
凝固 白濁 変化なし

第34図 卵黄緩衝液稀釈山羊精液の白濁、凝固

ついで20%卵黄液に精漿を加えて凝固させたものとそうでないものを1滴ずつとって顕微鏡下で観察したが、第35図に示されるように両者間にみられる大きな差は卵黄油滴の存否であった。非凝固のものでは卵黄の黄色色素が存在するのに凝固のものでは卵黄油が消失していることが知られた。



非 凝 固



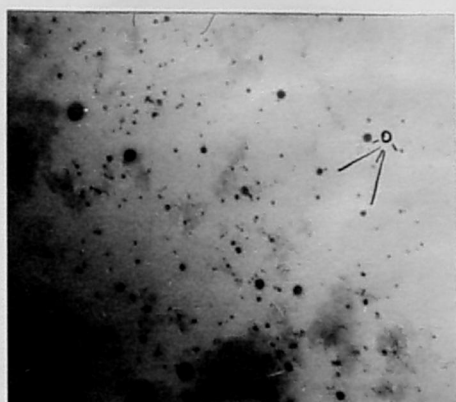
凝 固

第35図 非凝固，凝固卵黄緩衝液の顕微鏡的観察

これを SUDAN III で染色してみると第36図a. に示すように非凝固の卵ク液では卵黄油滴は橙赤色に染色されて散在する。これが凝固したものでは第36図b. に示すごとくなり油滴は認められず，かわつて粘稠なや流動性をもつた淡桃色不定形の油滴がみられる。もともと脂肪酸は SUDAN III に染色されないものであるが，この淡桃色の油滴はおそらく可染性の卵黄油滴が脂肪酸に吸着されてこのものが淡く染色されたのではないと思われる。これは後述の卵ク液に脂肪酸の一つオレイン酸を加えて白濁させた試料を染色した際にみられる油滴に近似していた。

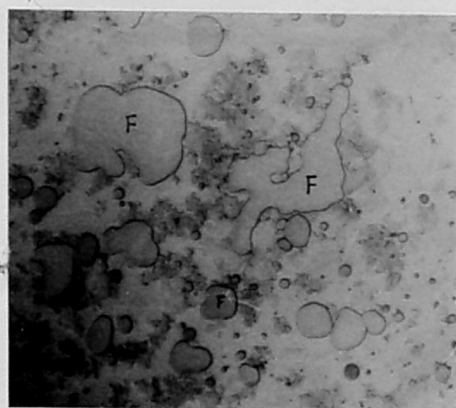
さらに凝固が極度にすすんだものでは第36図c. に示されるように脂肪酸と思われる油滴は板塊状に観察された。

このように酵素作用によつて生じた脂肪酸が卵黄油を吸着，吸収することが推察されたので，さらに両者の関係をみるために顕微鏡下で卵ク液に対してカバーガラスの間隙から脂肪酸として微量のオレイン酸を徐々に注入してみると第37図に示すように両者はきわめて親和性にとみ，視野内に侵入してくる脂肪酸がさかんに油滴を吸収していくのが観察された。以上の結果から白濁現象は色素をもつた卵黄油が酵素作用によつて生じた脂肪酸に吸収され黄色が被覆されるためではないと思われる。



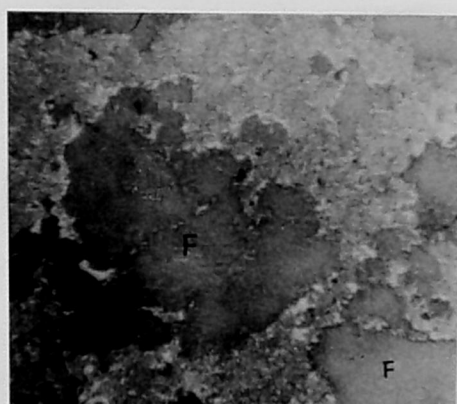
a) 非凝固

卵黄油滴；O



b) 凝固

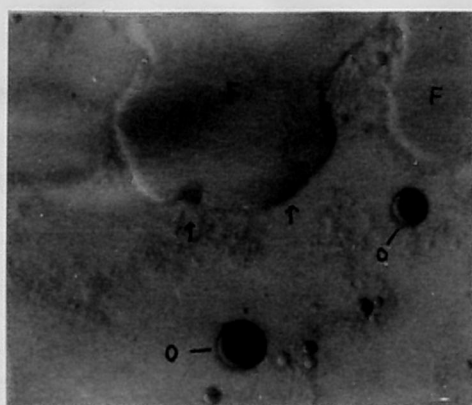
脂肪酸滴；F



c) 強度の凝固

脂肪酸塊；F

第36図 非凝固および凝固卵黄緩衝液の顕微鏡的観察

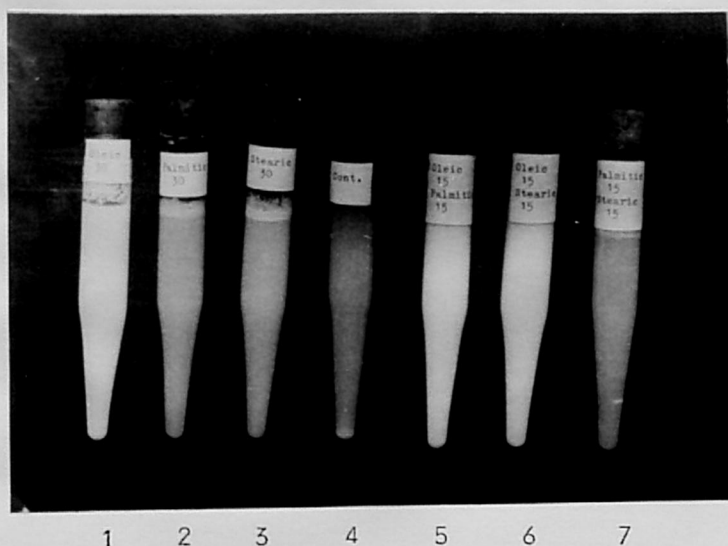


注： ↑ ; 吸着 O ; 卵黄油 F ; 脂肪酸 (Oleic)

第3.7図 脂肪酸 (Oleic) による卵黄油滴の吸着

2. 卵黄緩衝液に対する各種脂肪酸の人為的添加と白濁，凝固の有無

凝固時に遊離される脂肪酸の種類が第8章第3節の実験で明らかにされたので，これらの脂肪酸を凝固時の遊離量に相当する濃度になるように各種の組合せで卵黄液に人為的に添加し，白濁や凝固の有無をみた。その結果は第3.8図に示す通りである。



1. Oleic 30mg
2. Palmitic 30mg
3. Stearic 30mg
4. 対照 (無添加)
5. Oleic 15mg + Palmit. 15mg
6. Oleic 15mg + Stearic 15mg
7. Palmit. 15mg + Stearic 15mg

第3.8図 卵黄緩衝液への脂肪酸の人為的添加と白濁，凝固の有無

脂肪酸を全く加えなかつた卵黄液(対照)は黄色半透明であつた。オレイン酸 30mg/ml では著しく白濁するが凝固しなかつた。ついでパルミチン酸 30mg/ml 、ステアリン酸 30mg/ml の両者ではほとんど白濁もせず、凝固もみられず添加した脂肪酸の多くは卵黄液上層に分離した。つぎにオレイン酸 15mg/ml + パルミチン酸 15mg/ml 、およびオレイン酸 15mg/ml + ステアリン酸 15mg/ml の区では白濁と同時に凝固した。またパルミチン酸 15mg/ml + ステアリン酸 15mg/ml の区ではやや白濁したが凝固することなく、これらの脂肪酸の一部は卵黄液上層に分離した。これらの結果から白濁、凝固現象を吟味してみるとオレイン酸は卵黄油との親和性によつて白濁現象をひきおこし、凝固はしないが、ここにパルミチン酸やステアリン酸のような常温で固状の脂肪酸が存在すると、このものに卵黄油を吸収して増量したオレイン酸が加わつて凝固するのではないかと考えられる。

なお凝固の条件として卵黄油の存在意義を検討するためにあらかじめアセトンで卵黄を油脂区分と卵黄粉に分割しておいてその後卵黄粉と卵黄油をその収量に応じた割合で混合し3%クエン酸ソーダ液中に懸濁させた。一旦アセトンで分割した卵黄油と卵黄粉は混合してももとの卵黄のように均一に溶解せず卵黄油のみが上層に浮上する。このものに一方には対照として蒸留

水を他方には粗酵素液として精漿を加えておく。と第39図に示すように 4°C に2日間保存後振とうすると対照区では卵黄油は再び卵黄粉と分離して浮上するが精漿添加区では卵黄油は分離せず全体が凝固する。これはおそらく精漿添加区では酵素作用により卵黄粉中の磷脂質から脂肪酸が遊離され脂肪酸が卵黄油と結合して全体が凝固したものと思われる。この場合卵黄油がなければ酵素が卵黄粉に作用して脂肪酸を遊離しても凝固は起らなかった。

以上の結果から次の模式図(第34表)に示されるような機序が中心になつて白濁凝固のおこることが推察される。すなわち卵黄緩衝液の磷脂質区分に山羊精漿中の卵黄凝固酵素が作用して脂肪酸を遊離し、リゾレシチンが生ずるが、このうち不飽和酸の一つオレイン酸が卵黄油脂

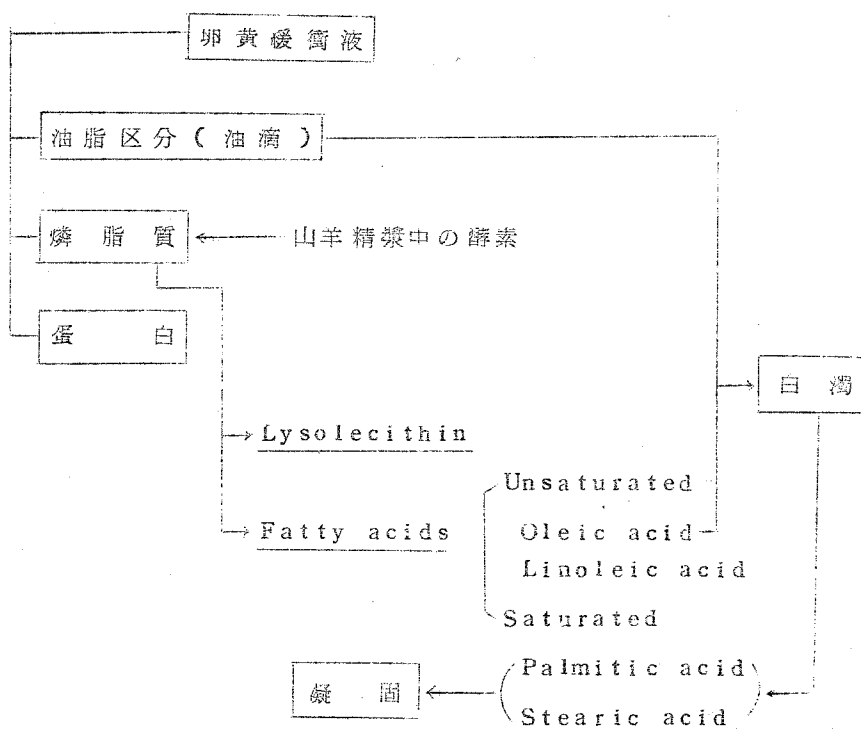


卵黄油	卵黄油
+卵黄粉	+卵黄粉
+蒸留水	+凝固酵素

第39図 卵黄油と卵黄粉の混合液での凝固の有無

区分に結合して白濁がおこり，さらにこの状態下で飽和酸であるパルミチン酸やステアリン酸が結合して凝固が起るものと考えられる。もつともこのような単純な機構以外に脂質蛋白の変性とか，吟味されなかつた他の種類の遊離脂肪酸なども凝固の発現に役割を果しているかも知れない。これらの点の解明はさらに今後の研究にまたれる。

第 3 4 表 凝 固 の 機 構



第3節 白濁凝固にともなう保存精子の死滅の原因

卵黄緩衝液稀釈山羊精液が白濁凝固にともなつて急激に衰弱し，遂には全滅することが知られているが，本実験ではこの原因について検討した。前述のように凝固時にはリゾレシチンや各種の脂肪酸が生成されるので，これらの生成産物が精子の生存性や呼吸能におよぼす影響をしらべた。なおこの酵素とは無関係に HARTREE et al⁹⁵⁾ は綿羊精子に対するリゾレシチンの有害性を報告しているのでこの結果も参照された。

I 実験の材料および方法

1. 精子の生存性ならびに呼吸能におよぼすリゾレシチンの影響

精子の生存性におよぼすリゾレシチンの影響をみるために3%クエン酸ソーダに0.04, 2, 4, 8, 40mM になるようにリゾレシチンを加え、また20%卵黄液の場合には0, 4, 8, 40mM になるように加えて、これらを稀釈液として山羊精液を10倍に稀釈して4℃に保存し、顕微鏡下で生存性を検査した。なお卵黄液を稀釈液とする場合には2回洗滌精子を使つて精漿中の酵素による凝固を防止した。また精子の呼吸能におよぼすリゾレシチンの影響をみるために山羊精子を3%クエン酸ソーダで2回洗滌し、約10倍稀釈クエン酸ソーダ精子浮遊液(約 $3\sim4\times 10^8/ml$)とし、これに0, 0.5, 1, 2, 4mMの濃度になるようにリゾレシチンを添加して37℃で2時間ワールブルグ検圧法で呼吸能を測定した。

なおリゾレシチンは、HANAHANの方法⁸⁷⁾によつてレシチンに蛇毒を加えて精製し、また多量の卵黄粉に尿道球腺抽出液を加えて強力に磷脂質を分解しクロロホルム抽出後エーテルで数回洗滌してリゾレシチンを沈澱せしめて調製した。

2. 精子の生存性ならびに呼吸におよぼす脂肪酸の影響

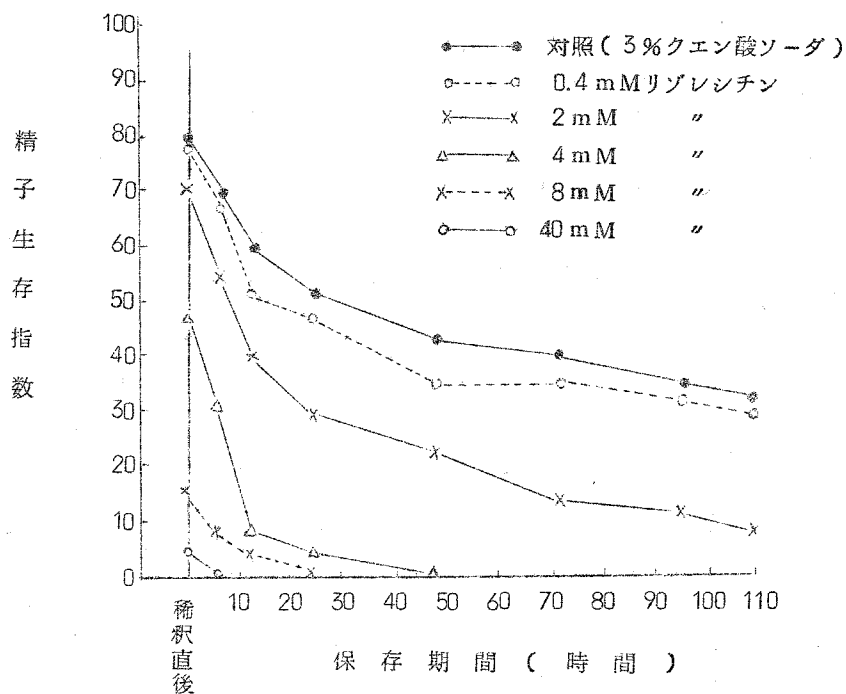
精子の保存試験には20%卵黄液にオレイン酸、パルミチン酸、ステアリン酸をそれぞれ3, 7, 30, 70mMになるように加えてこのものを稀釈液として洗滌精子を10倍に稀釈し、保存して活力検査を行つた。なお卵黄液稀釈精液での凝固時における脂肪酸量は約40~70mMであつて、極端な例では100mMに達する場合もみられた。このことを考慮して添加脂肪酸濃度を決めた。またクエン酸ソーダ液にオレイン酸を濃度0, 1, 3, 7, 10, 20, 30mMになるように添加して精子は洗滌せずに10倍稀釈し、4℃保存での生存性を検査した。呼吸能に及ぼす脂肪酸の影響についてはオレイン酸のみを用いたが、20%卵黄液に0, 15, 30, 60mMの濃度になるようにオレイン酸を加えたもので洗滌精子を約10倍に稀釈し、37℃で1時間ワールブルグ検圧法によつて呼吸能を測定した。

II 実験成績ならびに考察

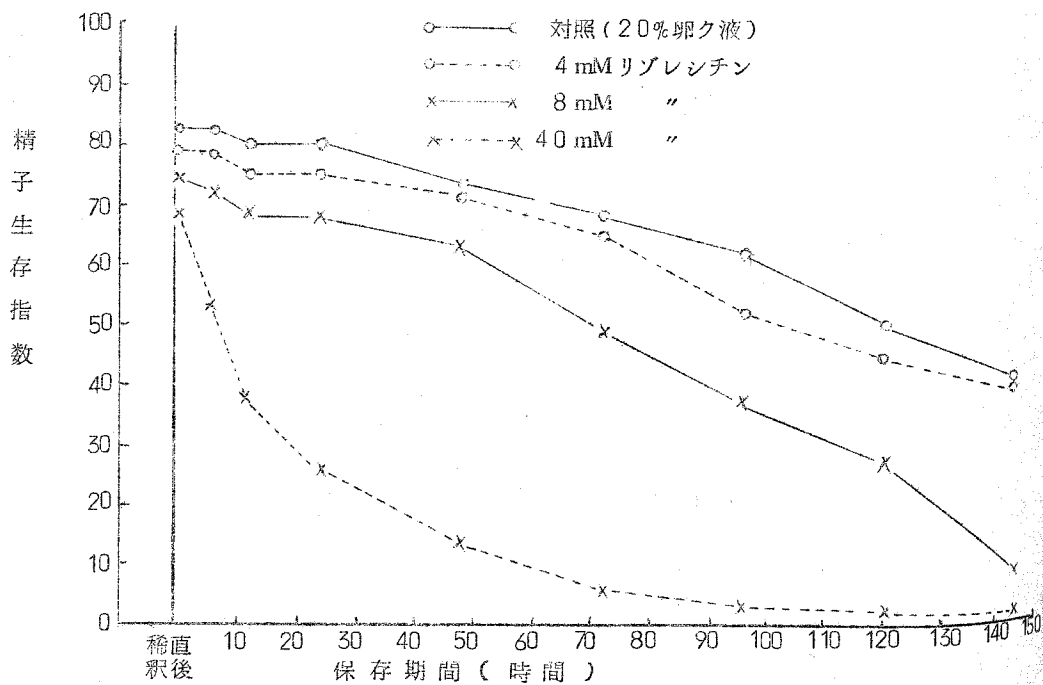
1. リゾレシチンの精子におよぼす影響

a) 精子の生存性におよぼす影響：

クエン酸ソーダ液にリゾレシチンを加えた場合には第40図に示すように0.4mM程度の濃度では大きな影響は及ぼさないが、2mMになると稀釈直後でも悪影響があらわれはじめ40mMにもなると4℃に保存後5時間で精子は全滅した。また卵黄液に加えた場合には第41図に示すように4mMではほとんど悪影響はないが、8mMになるとかなり顕著な影響があらわれ、さらに40mMになると著しく悪影響をあたえることが知られた。



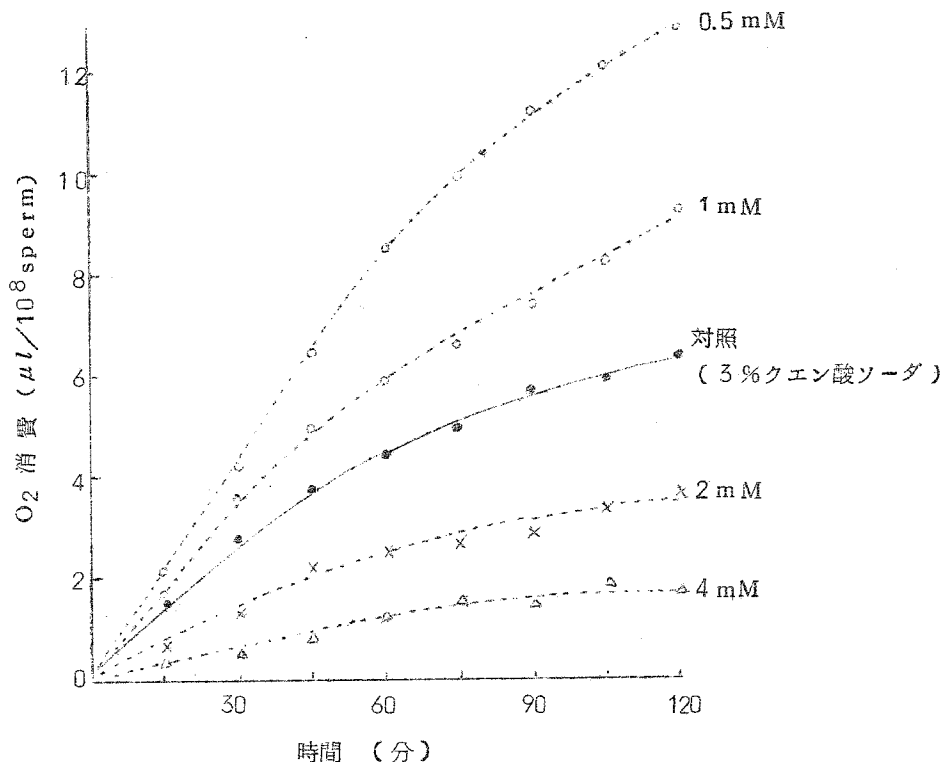
第40図 精子生存性に及ぼすリゾレシチンの影響



第41図 精子生存性に及ぼすリゾレシチンの影響

b) 呼吸能におよぼす影響

各種の濃度のリゾレシチンを3%クエン酸ソーダに加えて呼吸能におよぼす影響をみた。その結果は第42図に示すように0.5 mM, 1.0 mMではむしろ対照区よりもすぐれており、保存試験で0.4 mMですでに悪影響のみられたことと対照的である。しかし2 mM以上になると測定開始15分後においてすでに呼吸量は低下した。HARTREE et al.⁹⁵⁾ も綿羊精子



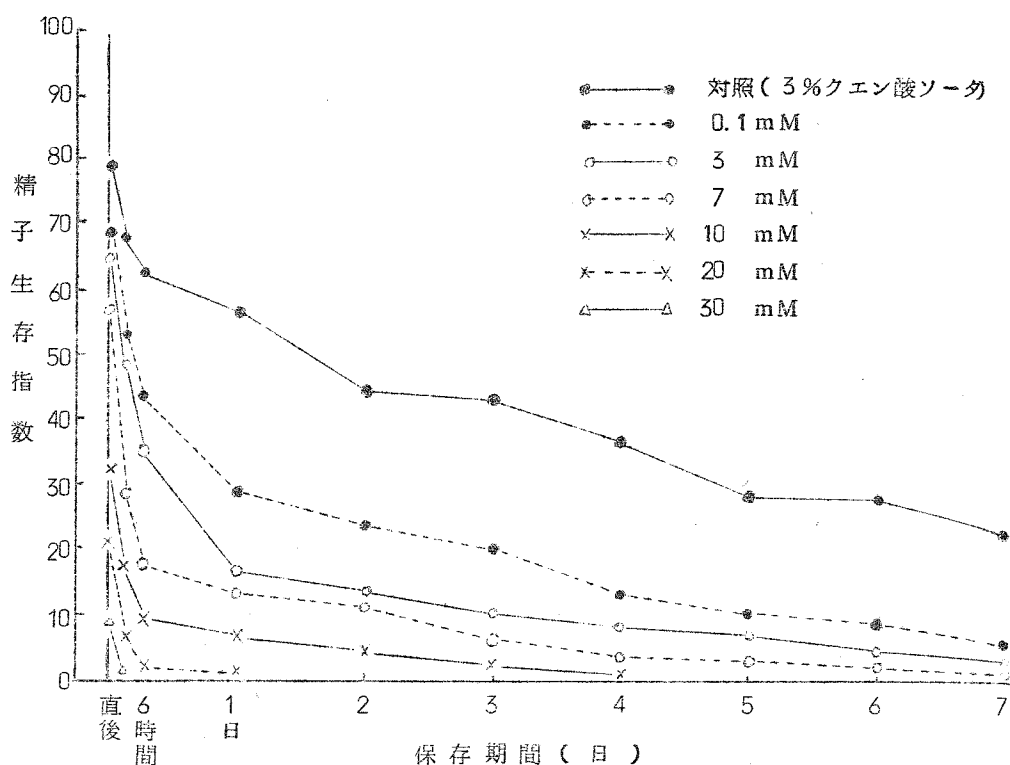
第42図 精子の呼吸におよぼす Lysolecithinの影響(2~4例)

についてはあるが、低濃度のリゾレシチンのかえつて呼吸を促進するが、高濃度(2 mM)になると抑制的に働くことを報告している。以上の保存試験と呼吸試験の結果から高濃度になるとリゾレシチンも精子に悪影響を及ぼすことが知られ、これも精子死滅の一因になっているものと思われる。

2. 脂肪酸の精子におよぼす影響

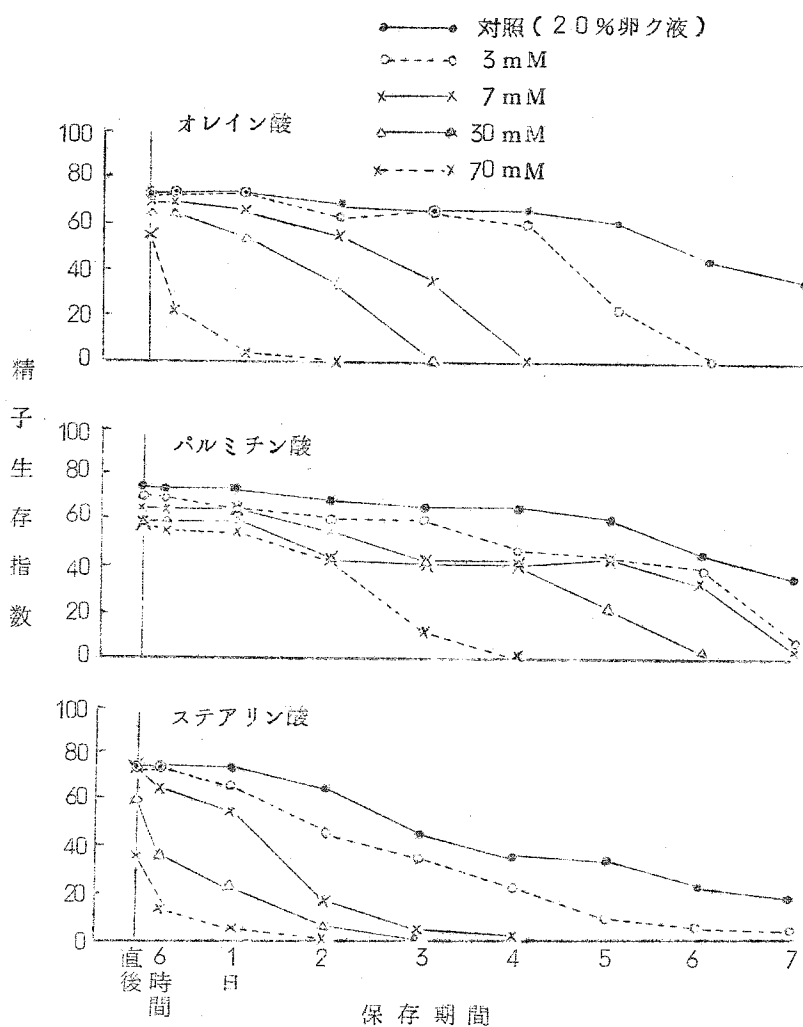
a) 精子の生存性におよぼす影響

3%クエン酸ソーダ稀釈精液にオレイン酸を添加すると第43図に示すようになり、0.1 mM



第43図 精子生存性に及ぼす脂肪酸（クエン酸液にオレイン酸の添加）の影響（3例）

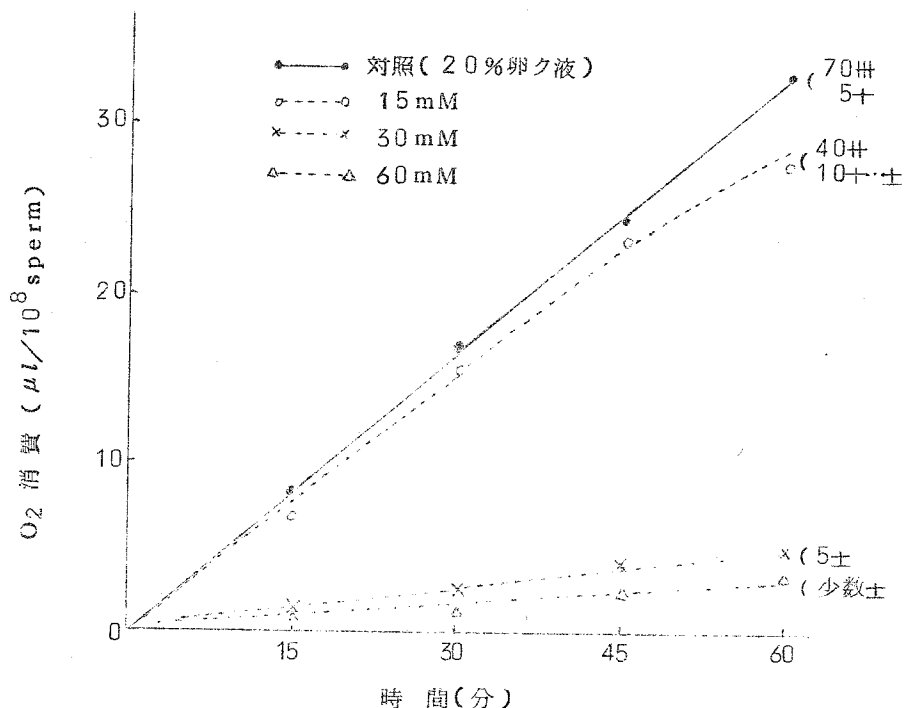
の濃度でさえ著しく悪影響を及ぼすことが知られた。また20%卵清液に各種の濃度の脂肪酸を加えて精液を稀釈した場合の影響を図示すると第44図に示すごとく、どの種類の脂肪酸でも3mMですでに添加の悪影響がみられ、30mMになると精子の生存性は極端に低下した。本実験に用いた3種類の脂肪酸のうちでは、オレイン酸が最も強く影響し、パルミチン酸、ステアリン酸がこれに付いていた。



第44図 精子生存性に及ぼす脂肪酸（卵黄液に脂肪酸の添加）の影響

b) 脂肪酸（オレイン酸）の添加が精子の呼吸におよぼす影響

実験結果は第45図に示すように15 mMでは呼吸能に大きな影響はみられなかった。しかし1時間振とう後の精子活力は $(\frac{40}{10} \pm \text{土})$ であつて対照の $(\frac{70}{5} \pm \text{土})$ に比べてかなり低下していた。30 mM以上の濃度になると測定開始時からすでに呼吸量が著しく低下し、1時間振とう後の活力も30 mMで $5 \pm$ 、60 mMでは少数士であつた。上述の保存試験の場合にくらべて37 °Cで振とうするとはるかにオレイン酸の影響が大きかつたが、これは保存温度の高いこと以外に高温下での振とうによつて脂肪酸の懸濁度がすすみ、精子に対する影響力も増大



第45図 精子の呼吸におよぼす脂肪酸(オレイン酸)の影響(2例)

されたのではないと思われる。

以上にリゾレシチンならびに脂肪酸の精子に対する影響を検討したが、凝固時の精子死滅の原因としてはリゾレシチンよりもむしろ脂肪酸の方が著しい影響を及ぼすものと思われる。なお凝固時に実測される脂肪酸量は、上述の結果から考えて充分精子を死滅せしめうる程度のものであつた。

第4節 摘 要

凝固現象の発現機序ならびに凝固時の精子死滅の原因について検討し大要つぎのような結果がえられた。

1. 凝固発現の機序としてつぎのように推定された。すなわち精漿中の卵黄凝固酵素が卵黄中の磷脂質に作用して脂肪酸を遊離し、脂肪酸のうち不飽和酸の一つであるオレイン酸が卵黄油を吸収して白濁を起し、これに飽和酸のパルミチン酸やステアリン酸が結合して凝固するものと考えられた。

2. 凝固時に生成されるリゾレシチンならびに脂肪酸の精子におよぼす影響を検討したが、リゾレシチンは高濃度で生存性ならびに呼吸能に悪影響を及ぼし、脂肪酸は凝固時に生成される濃度40~70 mM以下で精子の生存性や呼吸能に著しく悪影響をおよぼすことが知られ、凝固時の精子死滅の大きな原因になると考えられた。

第10章 卵黄緩衝液による稀釈山羊精液の 保存中における凝固防止の方法

第1節 緒 言

本実験は、これまでにえられた知見にもとづいて2, 3の凝固防止の方法について検討をこころみた。

第2節 精子の洗滌による凝固防止

第2章にのべたように、卵黄凝固酵素は精子とは無関係に精漿中に存在することが知られたので、精漿を除いた精子を使つて、保存中の凝固を防止し、これによつて精子の長期間保存を行おうとした。

I 実験の材料および方法

精液は採取後30℃下でリンゲル液、3%クエン酸ソーダ液または卵ク液を精液の2~3倍量加え、これを1500 r.p.m.で15分間遠心分離して上澄を棄て、沈澱精子に洗滌に使つた液を原精液量まで加えてよく攪拌しこれを1回洗滌精子とし、さらにこの操作をくり返して2回洗滌精子を調製した。非洗滌精液、洗滌精子ともにいずれも卵ク液で10倍に稀釈し、4℃に保存して活力検査をするとともに凝固の有無を検した。

II 成績ならびに考察

精子の洗滌と稀釈精液の凝固性との関係をしらべたが、第35表に示すように非洗滌精液では早いものでは、保存後1日で凝固し4~6日で凝固する例が最も多かつた。

1回の洗滌によつて少くとも3日間は全く凝固せず、保存7日以後に凝固する例が最も多か

第35表 精子の洗滌と稀釈精液の凝固性

	例数	凝固の発現頻度（保存日数別）									
		1	2	3	4~6	7~10	11~14	15~20	21~25	26~35	35<
非洗滌精液	59	6	7	13	30	2		1			
1回洗滌精子	62				8	19	11	20	4		
2回洗滌精子	16							2	6	5	3

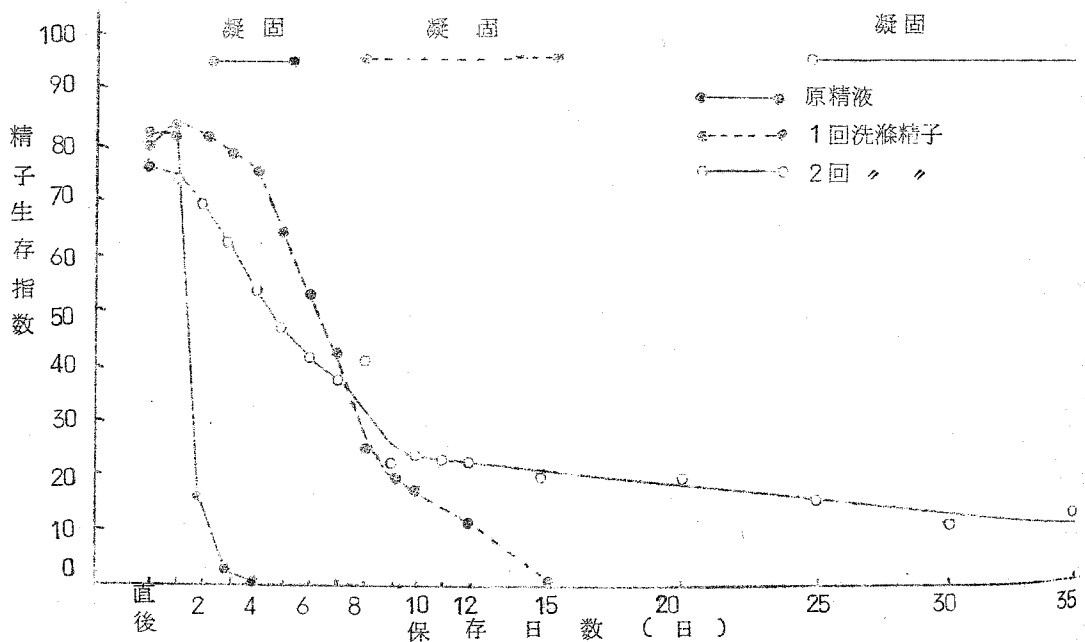
つた。なお2回洗滌精子では14日以内に凝固する例はみられず、35日以上にもわたって凝固しない例もあった。このように洗滌によつて凝固に至る日数を著しく延長しうることが知られたが、一方で精子の生存性に及ぼす洗滌の影響をしらべた。その結果第46図に示すように1回洗滌により稀釈後非洗滌のものより生存指数はひくいようであるが、ほとんど洗滌の影響はみられず5～6日間にわたって良好な保存性を示した。しかし2回洗滌精子では、保存中の凝固は防ぎえたが、精子の生存性は低く、これは明らかに洗滌の影響によるものと思われた。

洗滌による凝固防止の程度と洗滌操作が精子生存性に及ぼす影響の両者を考慮して人工授精への応用面を考えると、2回洗滌精子よりも1回洗滌精子の使用が望ましいと考えられる。

96), 97)

鳥飼らは、山羊精液の凝固を防止する目的で1回洗滌精子を卵黄緩衝液で稀釈し、最大6日間保存して授精試験を行つてゐるが、その結果、昭和34年度には、非洗滌精液、洗滌精子を使った場合の受胎率はそれぞれ49.6%, 60.8%であり、35年度にはそれぞれ80.0%, 62.5%, 洗滌精子のみを使った36年度の成績は64.8%であつた。この成績からみると洗滌しても、受胎率が34年度のように、すぐれた例もみられた。しかし35, 36年度の実験では洗滌精子の使用によつてむしろ受胎率は低下している。このことは洗滌操作を必要としないような有効かつ簡便な凝固防止の方法の発見への期待を大きくせしめるものである。

第46図 洗滌精子の保存成績(10～12例平均)



第3節 卵黄分割による非洗滌精液の保存

前章で凝固発現の機序がほとんども明らかになり、これによると卵黄緩衝液の凝固に卵黄油の存在が一つの要因になつてゐることが知られた。そこでこの節の実験では卵黄を有機溶媒によつて分割し、卵黄油を分離除去することによつて凝固を防止し、しかも精子に対して有効な結果がえられはしないかと考えて行われた。

I 実験の材料および方法

卵黄の分割は第8章第2節におけると同じ方法で行つた。調製した卵黄分割はいずれも溶媒を完全に蒸発除去させてから3%クエン酸ソーダ緩衝液に溶解または懸濁させて稀釈液とし、非洗滌山羊精子を10倍稀釈して4℃に保存し、7～10日後まで精子活力を検査し、その後稀釈精液中の脂肪酸量を第3章第2節の方法に準じて測定した。なお凝固の有無をたしかめるための試験では、稀釈精液を4℃に20日間保存した。

II 実験成績ならびに考察

各種の卵黄分割を基質にした稀釈液で10日間4℃に保存した場合の精子の活力検査の結果は第36表に示すとおりで、20%卵ク液以外の稀釈液では凝固は起らなかった。また凝固しなかつたもののうち精子の生存性に最も有効と思われた稀釈液は、卵黄蛋白と卵黄燐脂質の結合したいわゆる卵黄粉を基質にしたものであつた。卵黄粉稀釈液では凝固は起らなかったが、前述のようにこの凝固酵素は少くとも燐脂質を含む分割に作用して脂肪酸を遊離し、リゾレシチンを生成する筈であり、これらの産物は、精子に有害であることが知られている。

第36表 卵黄分割による精子の保存成績（5例中の1例）

▲ 白濁，× 凝固

稀 釈 液	直後	1日目	2	3	4	5	6	7	10
3%クエン酸ソーダ	70 +++ 5 +	40 +++ 10 +	40 +++ 10 +	40 +++ 10 +	40 +++ 10 +	35 +++ 10 +	30 +++ 10 +	30 ++ 10 ±	10 + 10 ±
20% 卵ク液	70 +++ 5 +	70 +++ 5 +	65 +++ 5 +	60 +++ 10 +	少数± ▲ 0 ×				
5% 卵黄粉	70 +++ 5 +	70 +++ 5 +	65 +++ 5 +	65 +++ 5 +	60 +++ 10 +	55 +++ 10 +	50 +++ 10 +	50 +++ 10 +	35 +++ 10 +
5% 卵黄蛋白	70 +++ 10 +	65 +++ 10 +	55 +++ 10 +	40 +++ 10 +	40 +++ 10 +	35 +++ 10 +	30 +++ 10 +	30 +++ 10 +	20 ++ 10 ±
5% 卵黄燐脂質	60 +++ 10 +	30 +++ 10 +	30 +++ 10 +	25 +++ 10 +	10 + 10 ±	10 + 10 ±	5 ± ±	少数±	0
2% 卵黄燐脂質	60 +++ 10 +	40 +++ 10 +	40 +++ 10 +	30 +++ 10 +	20 ++ 10 ±	20 ++ 10 ±	10 + 10 ±	10 + 10 ±	10 ± ±
2% 卵黄中性油脂	50 +++ 10 ±	5 ±	5 ±	少数±	0				

そこで稀釈後7日間保存した稀釈精液中での脂肪酸量を測定してみた。その結果第37表に示されるように稀釈液中の基質1g当りの脂肪酸量をみると凝固しなかつた卵黄粉や卵黄燐脂質の場合にも卵黄の半量程度ではあるがやはりかなりの量の脂肪酸を遊離することが知られた。しかしこれを稀釈液中の濃度にしてみると、20%卵ク液では3.198mg/mlであるのに対し5%卵黄粉では3.84mg/ml、2%卵黄粉では、わずかに1.54mg/mlにすぎなかつた。

第37表 卵黄分割による精子保存後の稀釈液中の脂肪酸産量（4例平均）

稀釈液の種類	稀釈液中の 基質1g当り (mg)	稀釈液 1ml当り (mg)	凝固の有無
20%卵ク液	159.9	3.198	3～6日後凝固
10%卵ク液	162.5	1.625	2～4日後凝固
5%卵黄粉	76.8	3.84	凝固せず
2%卵黄粉	77.1	1.54	〃
5%卵黄蛋白	8.4	0.42	〃
5%卵黄燐脂質	60.5	3.03	〃
2%卵黄燐脂質	73.2	1.46	〃
2%卵黄中性油脂	7.6	1.52	〃

なお卵黄粉や卵黄燐脂質を含む稀釈液で基質の単位量当りの脂肪酸量すなわち酵素作用が卵ク液の場合よりも低いのは、おそらく分割操作により卵黄中の燐脂質の酵素に対する被作用性が低下したのではないと思われる。

以上のように卵黄粉は酵素作用をうけて脂肪酸を遊離するが、稀釈液中に使用する卵黄粉濃度が5%程度であれば脂肪酸量は精子に対する有害量にまで達しないことが推定された。

一方卵黄粉濃度と精子の生存性との関係は第38表に示すごとくなり、2～4%程度の濃度の方がむしろ6%以上の場合よりも保存成績がすぐれており、上述の脂肪酸量と考え合わせても不都合はなく、卵黄粉の使用による非凝固性稀釈液調製の可能なことが知られた。

第38表 卵黄粉濃度と精子の保存性（3例中の1例）

稀 釈 液	直後	1日目	2	3	4	5	6	7	10
20%卵ク液	70 ⁺ 5+	75 ⁺	70 ⁺ 5+	65 ⁺ 5+	0 [▲]	×			
2%卵黄粉	75 ⁺ 5+	80 ⁺ 5+	80 ⁺ 5+	80 ⁺	75 ⁺ 5+	70 ⁺ 5+	70 ⁺ 5+	60 ⁺ 10+	40 ⁺ 10+
4% "	80 ⁺	85 ⁺	80 ⁺ 5+	80 ⁺ 5+	75 ⁺ 5+	70 ⁺ 5+	70 ⁺ 5+	60 ⁺ 10+	40 ⁺ 10+
6% "	80 ⁺	85 ⁺	80 ⁺ 5+	80 ⁺	75 ⁺ 5+	70 ⁺ 5+	65 ⁺ 10+	55 ⁺ 10+	30 ⁺ 10+
8% "	75 ⁺ 5+	80 ⁺ 5+	80 ⁺	80 ⁺	70 ⁺ 5+	65 ⁺ 5+	60 ⁺ 10+	50 ⁺ 10+	20 ⁺ 10+

注： ▲ 白濁 × 凝固

第4節 摘 要

これまでの実験でえられた知見にもとづいて、卵黄緩衝液稀釈山羊精液の保存中における凝固に対する2, 3の防止方法について検討した。

1. 山羊精子を洗滌して精液から精漿を取除くことにより、保存中の凝固に至る日数を著しく延長しうる。しかし洗滌の操作が精子に及ぼす悪影響を考えると実用的には2回洗滌精子よりも1回洗滌精子を用いた場合の方が精子の生存維持に有効である。

2. 各種の卵黄分割を基質にした稀釈液を調製し、凝固の有無、脂肪酸量、精子の保存

性などを検討したが、卵ク液以外の卵黄粉、卵黄蛋白、卵黄磷脂質、卵黄油脂などを基質にした緩衝液では凝固しなかった。

また2～4%濃度の卵黄粉稀釈液では脂肪酸量もきわめて少く、精子の保存性もすぐれていなかった。

家畜精子の体外保存に卵黄緩衝液がきわめて有効に使用され、これが現在のごとき牛の人工授精の飛躍的進展の動因になつたことはあまりに有名である。その後卵黄緩衝液は牛以外の豚、馬、綿羊、山羊などの精液稀釈剤として有効に応用されてきたが、ひとり山羊精液については種雄の個体により、これを卵黄緩衝液で稀釈して保存すると、保存後 3～5 日にして白濁しついでヨーグルト状に凝固してそれと同時に全精子が死滅することが経験された。このような凝固の事実はこれまでも知られていたが、凝固のメカニズムについてはほとんど知られておらず、もしかかる稀釈液の保存中における凝固が山羊精液の場合にのみみられるものとするれば、このことは山羊の精液性状の特性として生理学的に興味ある問題であり、またかかる凝固を防止して精子の生存延長をはかることは、人工授精への応用面からもきわめて必要なことと考えられる。著者はかかる凝固要因の本体ならびに凝固現象の実態を解明し、ひいては凝固防止の方法をも見出すことを目的に本研究に着手し、所期のいくつかの知見をえた。

I 凝固現象発現の 2, 3 の条件

この実験では凝固の起る条件につき概要を知るために、山羊およびそれ以外の家畜精液を、卵黄緩衝液で稀釈保存した際の凝固の有無、また山羊精液を卵黄以外の蛋白を含む稀釈液で稀釈保存した場合の凝固の有無などをしらべた。

1. 山羊精液を卵黄緩衝液で稀釈保存した場合にのみ凝固が起り、牛、豚、綿羊、兎、鶏、などの精液を稀釈保存しても凝固しない。
2. 山羊精液中の凝固要因は精漿中に存在し、精子は凝固現象に関与せず、またこの要因は煮沸によつてその機能を失うような物質であることが知られた。
3. 凝固現象は、卵黄を含む稀釈液に凝固要因を加えた場合にのみみられ、牛乳、山羊乳、山羊血清、卵白などと混合しても凝固しない。

II 凝固要因の諸性質

凝固要因の諸性質を明らかにすることは、要因そのものの本態を明らかにする上からも、凝固の強度を測定する際の条件を明らかにする上からもきわめて大切である。この実験では凝固作用と温度、 P^H 、卵黄濃度、凝固要因物質の濃度などとの関係をしらべ、さらに各種塩類、金属イオンその他 2, 3 の薬剤添加が凝固作用におよぼす影響についても検討した。

1. 凝固要因(精漿)自体を 50℃ 5 分間加熱することにより凝固作用はかなり害われ、60℃ 2～5 分の処理でほとんどその機能は失われた。凝固作用に対する最適温度は 40℃ 前後であつた。また凝固作用の速度は 40℃ に保存後 12 時間程度までほとんど低下しな

い。

2. 凝固作用に対する最適 P^H は 6.0 前後である。

3. 凝固の強さは、凝固の際産出された脂肪酸量または濁度で示される。脂肪酸量で示された凝固度は卵黄濃度 20% で飽和値に達し、濁度で示された凝固度は卵黄濃度 10% で最大値を示し、それ以上の高濃度ではかえって濁度は低下する。

4. 凝固要因の濃度と凝固度との間には、凝固要因の限られた濃度の範囲内では直線的関係が認められる。

5. 凝固作用に対して Co_2 、トランキライザーなどはかなり強力な阻害作用を有し、Na も高濃度ではわずかに阻害する。Sodium-dodecylsulfate (界面活性剤)、KCN、 $MgCl_2$ などは影響をあたえず、 $CaCl_2$ は中濃度で促進作用を示す。

以上のごとく凝固要因の性質がかなり明かになり、凝固要因物質が一種の酵素であることが推定された。

Ⅱ 凝固酵素の活性度と関連ある 2, 3 の条件

精液の採取季節、採取回次、枯渇採取、電気刺激採取など主として精液の採取条件が山羊精液中の卵黄凝固酵素の活性度（脂肪酸量で数的に示される）にいかに関与をおよぼすかが検討された。

1. 凝固酵素活性度は山羊の個体や採取季節とは無関係に、採取回次のすすむにつれて有意に上昇した。一方主として精の由来と考えられる果糖、クエン酸、蛋白などの濃度は酵素活性度とは異り、採取回次による有意差はみとめられなかつた。

2. 精漿中の凝固酵素活性度は繁殖季節に非繁殖季節よりも有意に高い。この傾向は果糖やクエン酸濃度と同様である。

3. 精液を人工鹽法で短時間内に連続 7 ～ 8 回採取した場合、凝固酵素活性度は回次の進むに従って上昇し 4 ～ 5 回目で 1 回目の約 5 倍程度になり、その後 7 ～ 8 回目までこの高値を維持した。これは精液量、精子濃度の回次の進むに従って極端に減少することや果糖、クエン酸、蛋白など精の成分の変動様相にくらべて特異的であつた。

4. 電気射精液の精漿中の凝固酵素活性度は人工鹽採取精液精漿中のものよりもはるかに高く、比活性度（蛋白 1mg 当りの活性度）で比較すると 6 倍程度も高かつた。また比活性度の高い精漿を射出した分割では、精子、果糖、クエン酸、蛋白などの濃度が著しく低い。このことは低電圧で射出される精子をほとんど含まぬ分割では精の成分は少いことを意味する。

Ⅳ 射出精液ならびに副生殖腺液の一般性状ならびに化学的組成と凝固酵素の存在との関連性の有無

山羊精液には他の家畜精液とくらべて特異的に卵黄凝固酵素を含むので、精液の一般性状、化学的性状などの点でも凝固酵素の存在との関連において、とくに無機塩類や脂質燐などのうち特異的な濃度を示す成分がみられはしないかと考えられた。しかし山羊精液の化学的性状については研究報告がきわめて少ないので、この実験ではこれらの点をたしかめるために射出精液や副生殖腺分泌液の一般性状ならびに化学的性状をしらべ、その結果を他の家畜精液についての成績と比較検討した。

1. 精液量、精子濃度、精液 P^H 、窒素化合物、蛋白、果糖、クエン酸などの濃度が明らかにされたが、これらのうち精液量、果糖、クエン酸、蛋白などの濃度は年間変異を示し、いずれも繁殖季節に上昇した。

2. 山羊精漿中の全窒素は牛、綿羊のそれらと大差はなかつたが、非蛋白窒素（トリクロール醋酸溶性）は著しく多く、牛、綿羊精液精漿の約4倍、豚のそれの約10倍であつた。しかし卵黄凝固酵素はフォスフォリパーゼの一種であり、したがって高濃度に存在する非蛋白窒素と酵素の存在とは関係ないものと思われる。

3. 燐化合物は分割して定量し、またK, Cl, Ca, Mg, Naなどの濃度が明らかにされたが、牛や綿羊精液にくらべて特異的な濃度を示す成分はみられず、凝固酵素の存在と関連深いと考えられる脂質燐の濃度も他の家畜のそれらとほぼ同じであつた。

4. 尿道球腺、精のうおよび前立腺液の化学的性状が明らかにされた。主なる特徴はつぎのごとくであつた。すなわち尿道球腺液のCa, Kの濃度が高く、 P^H が高く、非蛋白窒素が著しく多かつた。また精のう液には果糖、クエン酸、Mgなどが圧倒的に多く含まれていた。

以上の結果から山羊精液の一般性状ならびに化学的性状につきある程度の知見がえられたが、本実験の範囲内では牛や綿羊の精液とくらべて、凝固酵素の存在に関連すると思われるような成分のうち特異的な濃度を示すものはみとめられなかつた。

Ⅴ 凝固酵素の所在と由来

この実験は凝固酵素が生殖器官中のいずれの臓器の分泌液に由来するかをたしかめんとして行われた。

1. 精巣、精巣上体、精管、精管膨大部、精のう、前立腺、尿道球腺および尿道などの生殖器官臓器の抽出液について凝固酵素活性度を測定した結果、尿道球腺抽出液においてのみ著しい酵素活性がみとめられ、他の臓器抽出液では検出されなかつた。

2. 各生殖器官臓器について凝固酵素の組織化学的検索を行つたところ、尿道球腺組織に

のみ顕著に酵素が検出され、他の臓器組織では全くみとめられなかった。

3. 尿道球腺を剔除した2頭の山羊について剔除前後の酵素活性度を測定したところ、剔除によつて精液中の酵素活性度は約 $1/4$ 程度にまで急激に低下したが、完全には消失しなかった。この完全に消失しない原因は尿道球腺の腺体が尿道壁深く陥入しているため手術による完全剔除が困難なことによるものである。陥入組織中にも強い酵素活性が検出された。

VI 凝固酵素の精製

卵黄凝固酵素のごとき新たに知られた酵素については、これを精製することの意義が大きい。この実験では塩析法、分別吸着法、アセトン沈澱法により精製がこころみられた。

1. 山羊精漿に対する硫酸塩析法による分別沈澱では、硫酸濃度30%前後で全蛋白分割が同時に沈澱し、この方法による酵素の分別は困難である。

2. 山羊精漿を塩析、透析後磷酸カルシウムゲルに吸着させ、これを種々の濃度の磷酸緩衝液で分別溶出させることによつて、 $M/4$ 磷酸緩衝液溶出分割の酵素純度はかなり上昇し、出発材料としての精漿の約10倍程度となった。

3. 山羊精液に対するアセトン分割法では、アセトン濃度33%で沈澱する分割の酵素純度が高く、精漿の約4倍程度に純度を上げることができる。

4. 磷酸カルシウムゲル吸着法による分割およびアセトンによる分割を濾紙上に電気泳動させて分別分割の実態をたしかめたが純度の高い分割の移動度が低く、ほとんど酵素を含みぬ精のう由来と思われる蛋白分割の移動度が高いことが知られた。

VII 凝固酵素の卵黄に対する作用位置の確認と酵素の種類の推定

この実験では凝固時に凝固酵素が卵黄のいずれの成分に作用するか、また遊離される物質は何かなどを知らんとして行われた。

1. 乳酸の蓄積は精子を含む場合にのみみられ、卵黄緩衝液に精漿を加えて凝固させた場合には乳酸量は増加しない。このことから凝固と乳酸蓄積との間には直接関係はみられない。

2. 卵黄分割に対する凝固酵素の作用において卵黄の磷脂質からエステル結合がきれて脂肪酸が遊離されるが、磷酸は遊離されない。

3. 凝固した卵黄緩衝液について遊離脂肪酸と磷脂質に関するペーパークロマトグラフィーを実施した結果、遊離される脂肪酸の主なるものはオレイン酸、リノール酸、パルミチン酸、ステアリン酸であること、また磷脂質から脂肪酸が遊離され、リゾレシチンの生成されることが明らかにされた。

以上の結果から卵黄凝固酵素は蛇毒性のものと類似のフォスフォリパーゼAに属する酵素と推定される。

Ⅷ 凝固現象の発現機序ならびに凝固時の精子死滅の要因

山羊精液を卵黄緩衝液で稀釈保存した場合に起る白濁，凝固などの物理的な随伴現象がどのような機序で起るか，また白濁や凝固にともなつて保存精子が急激に全滅するが，この原因は何であるかを知らんとした。

1. 凝固発現の機序は精漿中の卵黄凝固酵素が卵黄中の磷脂質に作用して脂肪酸を遊離し脂肪酸のうち不飽和酸の一つオレイン酸が卵黄油を吸収して白濁を起し，これに飽和酸のパルミチン酸やヤステアリン酸が結合して凝固するものと考えられる。

2. 凝固時に生成されるリゾレシチンは高濃度では精子の生存性ならびに呼吸能に悪影響をおよぼし，脂肪酸は凝固時に遊離される濃度40～70 mM以下で精子の生存性や呼吸能を著しく障害する。これらの生成産物が精子死滅の大きな原因になるものと思われる。

Ⅸ 卵黄緩衝液稀釈山羊精液の凝固防止の方法

これまでにえられた知見にもとづいて2，3の凝固防止の方法につき検討した。

1. 山羊精子を洗滌して精液から精漿を取除くことによつて保存中の凝固に至る日数を著しく延長しうるが，洗滌操作が精子におよぼす悪影響と凝固防止可能日数の両者を考慮して実用的には一回洗滌精子を稀釈保存することによつて凝固防止の目的は達せられる。

2. 各種の卵黄分割を基質にした稀釈液を調製し，凝固の有無，脂肪酸量，精子の保存性などを検討したが，卵ク液以外の卵黄粉，卵黄蛋白，卵黄磷脂質，卵黄油脂などを基質にした稀釈液では凝固しない。これらの分割のうち2～4%濃度の卵黄粉を基質にした稀釈液では脂肪酸の生産はきわめて少く，精子の保存性もすぐれていた。

稿を終るに当り終始御指導御教示を賜わつた恩師西川義正教授に深甚の謝意を表する。

またたえず御激励をいただいた恩師上坂章次教授に対し深く感謝する。

さらに本研究の遂行上有益な助言，助力をいただいた京都府立大学野田万次郎教授，本学食糧科学研究所長谷川喜代三助教授。山田秀明講師に対し深く感謝する。

また実験材料の提供その他御便宜を与えられた滋賀県種畜場立川牧夫場長，鳥飼善夫技師，三重県畜産試験場野呂 正技師，鳥取県畜産試験場渡辺 彰技師に対し深く感謝する。

なお本研究の実施に当り，たえず有益な助言，御指導をいただいた本学畜産学第二研究室吉田重雄助教授に対し深く感謝する。また大学院学生福原利一，榊田博司，長沢成吉，西村一三，加藤征史郎の五君ならびに専攻生諸君の絶大な協力をいただいたことに対し心から謝意を表する。

引 用 文 献

- 1) Philips, P.H. & Lardy H.A. (1940) J. Dairy Sci., 23:399.
- 2) 西川 (義), 和出 (喲) (1949) 日畜学会報, 20:123.
- 3) 吉岡 (善), 犬童 (幸), 鳥塚 (俊) (1951) 農技研報告, G, No. 1, 53.
- 4) 吉岡 (善), 小池 (捨) (1954) 日畜学会発表
- 5) Blokuis, J. (1951) Tijdschr. Diergenesk., 82:570.
(c.f. A.B.A., 25:403)
- 6) Wagner, H. (1951) A.B.A., 19:362.
- 7) Setinski, Z., Pericarić, J. & Kaciga, M. (1956) Vet. Glasn.,
10:906 (c.f. A.B.A., 26:63)
- 8) 西川 (義), 和出 (喲) (1960) 畜産の研究, 14:1109.
- 9) Roy, A. (1957) Nature, 179:318.
- 10) 工藤 (勘) (1957) 中部日本種鶏会, 1-5.
- 11) 西川 (義), 和出 (喲) (1949) 日畜学会報, 20:51.
- 12) Van De Kamer, J.H., Huinik, H.B. & Weyers, H.A. (1949)
J. Biol. Chem., 177:347.
- 13) Willstätter, R., Kuhn, R., Lind, O. & Memmen, F. (1951)
A.B.A., 19:362.
- 14) Somogyi, M. (1940) J. Biol. Chem., 134:301.
- 15) Smyth, C.V. (1939) Enzymologia, 6:9.
- 16) Michaelis, L. & Menten, M.L. (1913) Hoppe-Seyler's Z.,
49:333 (c.f. 酵素研究法 I, 262, 1955)
- 17) Lineweaver, H. & Burk, D. (1934) J. Amer. Chem. Soc., 56:658.
- 18) Alles, G.A. & Hawes, R.C. (1940) J. Biol. Chem., 133:375.
- 19) 宿谷 (良) (1951) J. Biochem., 38:225.
- 20) Kudicke, R. & Sachs, H. (1916) Biochem. Z., 76:359.
- 21) Delezenne, C. & Fourneau, E. (1932) Bull. Soc. Intern.
Microbiol., 4:399.
- 22) Ogawa, K. (1936) J. Biochem., 24:389.

- 23) De, S.S. (1940) *Ind. J. Med. Res.*, 27:793.
- 24) Bernshon, J. et al. (1956) *Arch. Biochim. et Biophys.*, 62:274.
- 25) 楊河(正) (1958) *日藥理誌*, 54:1141.
- 26) Roe, J.H. (1934) *J. Biol. Chem.*, 107:15.
- 27) Natelson, Lugovoy & Pincus (1947) *J. Biol. Chem.*, 170:597.
- 28) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Forr A.L. & Randall, R.T.
(1951) *J. Biol. Chem.*, 193:265.
- 29) Luktuke, S.N. & Bhattacharya, P. (1958) *Indian J. Physiol. & Allied Sci.*, 12:74.
- 30) Mann, T. (1948) *J. Agric. Sci.*, 38:323.
- 31) Leidl, W. (1958) *Klima und Sexualfunktion männlicher Haustiere*, M.H. Schaper, Hannover.
- 32) Leidl, W. & Bronsch, K. (1959) *Zentralblatt für Veterinärmedizin*, 6:28.
- 33) 広江(一), 富塚(常), 和出(端), 正木(淳) (1960) *家畜繁殖誌*, 6:28.
- 34) Gutman, A.B. (1942) *J. Amer. Med. Assoc.*, 120:1112.
- 35) Engberg, H., Anderson, E., Sury, B. & Raft, J. (1947)
J. Endocrinol., 5:42.
- 36) Barker, J.B. & Summerson, W.H. (1941) *J. Biol. Chem.*,
138:535.
- 37) 小林(茂) (1958) *臨床検査*, 2, 75, 139.
- 38) Lutwak-Mann & Rowson, L.E.A. (1953) *J. Agric. Sci.*,
43:131.
- 39) 広江(一), 富塚(常), 和出(端), 正木(淳) (1960) *家畜繁殖誌*, 6:19.
- 40) Mann, T. (1960) *The biochemistry of semen*, Methuen Co.
- 41) Cupps, P.T., McGowan, B. & Rahlman D.F. (1960) *J. Anim. Sci.*, 19:208.
- 42) Roy, A., Karnik, Y.R., Luktuke, S.N., Bhattacharya, S. &
Bhattacharya, P. (1950) *Indian J. Dary Sci.*,
3:42.

- 43) Eaton, O. & Simmons, V. (1952) Amer. J. Vet. Res., 13, 537.
- 44) Phillips, R.W., & Schott, R.G., Eaton, O.N. & Simmons, V.L.
(1943) Cornell Vet., 33:227.
- 45) Shukla, D.D. & Bhattacharya, P. (1952) Indian J. Vet.
Sci., 22:179.
- 46) Sharma, G.P., Suri, K.R. & Vali, K.N. (1958) A.B.A., 26:63.
- 47) Schneider, W.C. (1945) J. Biol. Chem., 161:293.
- 48) Gomori, G. (1942) J. Lab. Clin. Med., 27:955.
- 49) Mosker, R.E., Royle, A.J., Bird, E.D., Jacobson, S.P.,
Batskeln, T.M., Iseri, L.T. & Meyer, G.M. (1949)
Amer. J. Clin. Path., 19:461.
- 50) Sobel & Kayne (1940) Ind. Eng. Chem Anal Ed., 12:118.
- 51) Kunkel, Pearson & Schweigert (1947) J. Lab. Clin. Med.,
32:1027.
- 52) 吉川 (春) (1955) 臨床医化学, 28.
- 53) McKenzie, F.F., Miller, J.C. & Bauguess L.C. (1938) Res.
Bull. Mo. Agric. Expt. Sta., No. 279.
- 54) Huggins, C., Scott, W.W. & Heinen, J.H. (1942) Amer. J.
Physiol., 136:467.
- 55) Jacobson, L. (1950) Acta Physiol. Scand., 20:88.
- 56) Mann, T., Davis, D.V. & Humphrey (1949) J. Endocrinol.,
6:75.
- 57) Mann, T. (1959) Reprod. Domestic Anim., Acad. Press, 66.
- 58) Huggins, C. & Jacobson, A.A. (1933) Amer. J. Physiol.,
103:574.
- 59) Bernstein, A.D. (1937) Bull. Biol. et méd. Exper. URSS,
4:483.
- 60) Moore, B.H. & Meyer, D.T. (1941) Univ. Mo. Res. Bull.,
No. 338.
- 61) Mann, T. (1946) Nature, 157:179.

- 62) Humphrey, G. F. & Mann, T. (1949) *Biochem. J.*, 44:97.
- 63) 赤堀 (四) 編 (1955) 酵素研究法 I, 11.
- 64) 笹川 (泰), 木村 (徳), 片山 (久) (1954) 酵素化学シンポジウム, 10:103.
- 65) 高松 (英) 他 (1951) 日本病理学会誌, 40, 地方会号, 137.
- 66) 都甲 (元) (1952-'53) 東京医学会雑誌, 60:297.
- 67) 赤堀 (四) 編 (1955) 酵素研究法 I, 130.
- 68) 赤堀 (四) 編 (1955) *ibid.*, I, 160.
- 69) 赤堀 (四) 編 (1955) *ibid.*, I, 140.
- 70) Cabib, E. (1951) *Biochem. et Biophys. Acta*, 7:604.
- 71) Cabib, E. (1952) *ibid.*, 8:607.
- 72) Acker, L., Diemair, W. & Jäger, R. (1952) *Biochem. Z.*,
322:471.
- 73) Nelson, N. (1944) *J. Biol. Chem.*, 153:375.
- 74) Folin, O. & Malmros, H. (1929) *J. Biol. Chem.*, 83:115.
- 75) Schmidt, G., Bessman, M. J., Hickey, M. D. & Thanhauser, S. J.
(1956) *J. Biol. Chem.*, 223:1027.
- 76) 長谷川 (喜) (1960) 日本農芸化学会誌, 34:879.
- 77) Hartree, E. F. & Mann, T. (1959) *Biochem. J.*, 71:423.
- 78) Schmidt, G. & Thanhauser, S. J. (1945) *J. Biol. Chem.*,
162:83.
- 79) Schneider, W. C. (1946) *J. Biol. Chem.*, 164:747.
- 80) Bloor, W. R. (1929) *J. Biol. Chem.*, 82:273.
- 81) Feulgen R., Boguth, W. & Anderson, G. (1951) *Hoppe-Seyl.*
Z., 187:90.
- 82) Christl, H. (1953) *Hoppe-Seyl. Z.*, 293:83.
- 83) Stern, I. & Shapiro, B. (1953) *Brit. J. Clin. Path.*, 6:158.
- 84) 野田 (万), 平山 (修) (1961) 油化学, 10:24.
- 85) Inoue, Y., Hirayama, O., & Noda, M. (1956) *Bull. Agr. Chem.*
Soc. Japan, 20:197.
- 86) Pangborn, M. C. (1951) *J. Biol. Chem.*, 188:471.

- 87) Hanahan, D. J. (1952) J. Biol. Chem., 159:199.
- 88) Marinetti, G. V. (1961) Biochim. et Biophys. Acta, 46:468.
- 89) Marinetti, G. V. & Stotz, E. (1960) ibid., 37:571.
- 90) Marinetti, G. V. & Stotz, E. (1956) ibid., 21:168.
- 91) Marinetti, G. V., Erbland, J. & Stotz, E. (1958) J. Biol. Chem., 233:562.
- 92) Marinetti, G. V., Albrecht, M., Ford, T. & Stotz, E. (1959) Biochim. et Biophys. Acta, 36:4.
- 93) Hanahan, D. J., Rodbell, M. & Turner, L. D. (1954) J. Biol. Chem., 206:431.
- 94) 赤堀(四)編(1955)酵素研究法, II, 33.
- 95) Hartree, E. F. & Mann, T. (1960) J. Reprod. Fertil., 1:23.
- 96) 鳥飼(善), 多羅尾(俊), 立川(牧), 西川(義) (1961) 日畜学会発表.
- 97) 鳥飼(善), 多羅尾(俊), 立川(牧), 西川(義) (1962) 日畜学会発表.

Studies on the Egg yolk Coagulating Enzyme in Goat Semen.

It has often observed that goat semen, when diluted with egg yolk containing buffer solution, maintains a good motility for a few days, and that it then suddenly becomes turbid accompanied by complete death of spermatozoa and coagulates like pudding. This coagulation has been a great disadvantage for practice of artificial insemination in goat and for physiological studies on goat spermatozoa. The author already recognized that this phenomenon was characteristic of goat semen and of great interest from a physiological point of view.

This study was performed to clarify characteristics of a factor causing coagulation, and to contribute to elongation of the life-span of goat spermatozoa in dilution, by preventing the occurrence of the coagulation through knowledge to be obtained from the results of this study.

I. Location of the coagulating factor and some conditions for coagulation.

This experiment was carried out to determine the location of the coagulating factor in the semen and to examine whether goat semen coagulates or not when diluted

with the other kind of dilutor that contained no egg yolk. The results are as follows.

1. The egg yolk coagulating factor was found in goat semen but not in bull, sheep, pig, rabbit and fowl semen. The factor found in the goat semen was derived from seminal plasma.

2. The factor lost its coagulating activity when heated in boiling water for five minutes.

3. Coagulation occurred only when the coagulating factor was added to a solution containing egg yolk, but not when the solution contained milk, blood plasma, or egg white.

II. Properties of the coagulating factor.

Since it seemed very important and necessary to clarify properties of the factor and influential conditions for its activity in order to determine optimal conditions for measuring coagulating activity and to examine whether the factor is a kind of enzyme or not, a further experiment was carried out to investigate some conditions, such as temperature, p^H , egg yolk concentration and addition of inorganic elements or some drugs, which are influential to the coagulating activity. The results are as follows.

1. Heating the factor at 50°C for five minutes was harmful to its coagulating activity. Heating at 60°C for two to five minutes suppressed most of the activity. The optimal temperature for coagulation was 40°C. The velocity of coagulation did not decrease during 12 hours of incubation at 40°C and then gradually decreased.

2. The optimal p^H value for coagulation was about 6.0.

3. The concentration of egg yolk in a reaction mixture for the maximum velocity of coagulation in each case was about 20 % and 10 % when expressed by the amount of fatty acid produced and optical density, respectively.

4. A linear relationship was found between the coagulating activity and the concentration of the coagulating factor within a limited range.

5. Addition of each of cobalt, tranquilizer (chlorpromazine-S-oxide), and surface detergent (tween 20) inhibit the coagulating action, and concentrated sodium also inhibits it slightly. Calcium promote the coagulating activity in medium concentration. Potassium cyanide, magnesium and a kind of surface detergent (sodium dodecylsulfate) have no influence on the activity.

From these results, it was possible to state the

optimal conditions for coagulation. These findings will contribute to precise determination of the coagulating activity. It was found that the coagulating factor had many properties similar to those of enzymes, and the factor seems to be a kind of enzyme.

III. Some of the factors affecting the activity of the egg yolk coagulating enzyme with special reference to conditions of semen collection.

This experiment was performed to clarify the variations in the enzyme activity owing to the successive collections and the season when the semen was collected throughout the year. The results are as follows.

1. Activity of the egg yolk coagulating enzyme was significantly higher in the breeding season, August to March, than in the non-breeding season.

2. It was recognized that the enzyme activity of the seminal plasma was enhanced significantly as the collection was repeated, from the results of 110 trials of three successive ejaculations with three goats throughout the year.

3. There was no significant difference in concentrations of fructose, citric acid and protein in seminal

plasma among the collection times, the 1st, the 2nd and the 3rd, in contrast to the results obtained for the enzyme activity.

4. Activity of the egg yolk coagulating enzyme in the semen collected 7-8 times successively in about an hour was 11.60 mg/0.1 ml in the 1st collection, and was markedly increased up to the 5th collection, the increased activity, 51.43 mg/0.1 ml, being maintained up to the 8th collection in contrast that concentrations of the seminal fructose, citric acid and protein that may be secreted from the seminal vesicle were slightly decreased as the collection time was advanced from the 1st to the 8th.

From the above results it was suggested that the secretory functions of the seminal vesicle and of the Cowper's gland may be considerably different.

IV. Chemical properties of the ejaculated goat semen and the secretion of accessory sexual organs of goat.

On the chemical composition of goat semen, only a few reports have been issued. In this experiment the chemical constituents of the goat semen collected from each of three goats during 12 to 24 months were examined. And five goats were killed for determining the chemical

composition of the secretions of their accessory sexual organs. On the other hand, it has already been known that the egg yolk coagulating enzyme exists in the goat semen characteristically, so we also intended to examine the presence of constituents that characterizes the goat semen in comparison with the semen of other farm animals. The results are as follows.

1. The p^H value of the ejaculated goat semen was 6.5 on the average (Brom Thymol Blue test paper method). Semen volume and sperm density were 0.63 ml and 37.5×10^8 /ml on the average respectively. Semen volume was larger in the breeding season than in the non-breeding season, while sperm density was higher in the non-breeding season.

2. Concentration of the total nitrogen in the seminal plasma of ejaculated goat semen was about the same as in bull or ram semen, and non-protein nitrogen was about 4 times as much as in bull and ram semen and 10 times as much as in boar semen. Concentrations of fructose and citric acid in the seminal plasma were 707.7 mg/dl and 384.0 mg/dl respectively, and the amounts of these constituents were extremely larger in the breeding season than in the non-breeding season.

3. Phosphorous compounds were analyzed on each of fractions fractionated by Schneider's method. A large amount of acid-soluble phosphorus was detected in the seminal plasma and the level of nucleic acid phosphorus was high in the sperm. Concentrations of potassium and chloride were considerably higher in goat seminal plasma than in ram semen, and the levels of calcium, sodium and magnesium were about the same as in ram semen.

4. General properties and chemical composition of the accessory sexual gland secretions of goat were as follows.

The p^H value of the Cowper's gland secretion was extremely higher than that of the seminal vesicle or the prostate gland, being 8.3 (electrode) on the average of seven Cowper's glands. Concentration of total nitrogen was higher in the secretion of each gland than in the seminal plasma, and the non-protein nitrogen level (T.C.A. soluble) was high especially in the secretion of the Cowper's gland. Most of fructose and citric acid were detected in the seminal vesicle secretions, only a small amount being in the other two glands. Concentration of the total or the acid-soluble phosphorus was rather low in the secretions of any of these three glands than in the seminal plasma. Calcium and potassium were found in relatively

large amounts in the Cowper's gland secretion, and the magnesium level was extremely high in the seminal vesicle secretion.

From the above results the chemical composition of goat semen was clarified considerably, and it seems that there was no marked difference in the semen characteristics between goat and other farm animals such as bull and ram, especially with reference to the presence of an egg yolk coagulating enzyme in goat semen.

V. Localization of the egg yolk coagulating enzyme in genital organs.

Since it is already known that the enzyme exists in the seminal plasma of goat semen, this experiment was performed to confirm the organ of the genital tracts which secretes the enzyme. A further experiment, ectomy of the enzyme secreting organ and histochemical determination of the enzyme in its organ, was carried out to reconfirm the enzyme secreting mechanism. The results are as follows.

1. Activity of the coagulating enzyme was detected only in the Cowper's gland extracts and not in the other organs such as testis, epididymis, vas deferens, seminal vesicle, prostate gland and urether.

2. Egg yolk coagulating enzyme was markedly

detected in the tissue of Cowper's gland histochemically and not in the other organs stated above.

3. Enzyme activity was measured on the semen collected from two goats whose Cowper's glands were ectomized, and it was found that the enzyme activity was markedly decreased to a fourth compared with that of the semen collected from pre-ectomized goat, but was not lost completely. And it was confirmed that the rest of enzyme activity in the semen collected from the ectomized goat was due to the residual tissue of the Cowper's gland.

VI. Purification of the egg yolk coagulating enzyme.

Existence of the egg yolk coagulating enzyme in goat semen was found recently, yet its purification has not been attempted. It is generally very important and significant to extract an enzyme in a purified state in order to clarify the characteristics especially for those discovered such as the one discussed here. In this experiment, the author tried to purify the enzyme by the following methods; salting out by ammonium sulfate, selecting adsorption with tricalcium phosphate-gel, and the acetone fractionation. The results are as follows.

1. Selecting precipitation method with ammonium sulfate was tried on the goat seminal plasma to obtain the

enzyme rich fraction, but most of the seminal plasma protein was abruptly salted out at around 30 % ammonium sulfate. And it was difficult to extract the enzyme rich fraction by this method.

2. Then the selecting adsorption method was performed. Seminal plasma protein was salted out adding an equal volume of saturated ammonium sulfate, and dialyzed the precipitated protein for 12 hours at 4°C, then it was adsorbed to the tricalcium phosphate-gel, and the selecting elution was made adding various concentrations of the phosphate buffer to the protein adsorbed calcium-gel. As the result, considerably purified enzyme was obtained from the fraction eluted into 0.25 M phosphate buffer. Besides, the purity of the enzyme in this fraction was about 10 times higher than that of the starting material, seminal plasma.

3. Purification of the coagulating enzyme was performed by the acetone fractionation starting from the goat seminal plasma. Acetone was added to the goat seminal plasma to obtain mixtures of 33 %, 45 %, 51 %, 62 %, 67 %, and 77 % in concentration at 0°C, then each of the precipitated fraction was obtained after ultracentrifugation. Thus, it was confirmed that the fraction precipitated at

the concentration of 33 % acetone shows the highest specific activity, and the purity of the enzyme was about 4 times higher than that of the starting material, goat seminal plasma.

Furthermore, paperelectrophoretic studies were performed on each of the fraction obtained above. And it was clarified that the enzyme-rich fraction shows low mobility, and the remaining 4 fractions free from most of of the enzyme have high mobility.

VII. Clarification of the position of egg yolk constituents attacked by the coagulating enzyme and the kind of this enzyme.

It is already known that a sudden drop of p^H accompanied coagulation and it is probable that the coagulating factor acts on egg yolk constituents such as phospholipids and releases some acids, which cause the drop of p^H . This experiment was performed to clarify the position of yolk constituents which would be attacked by the coagulating enzyme and the biochemical changes in the egg yolk constituents when coagulation occurred. Furthermore, it was also one of the aims of this experiment to obtain some knowledge on the nature and the kind of this enzyme. The results are as follows.

1. It was found that there was no relationship among the decrease of p^H , the coagulation phenomenon, and accumulation of lactic acid in diluted semen.

2. It was found that the coagulating enzyme acts on the ester linkage with acyl group of the egg yolk phospholipids, and release fatty acids, but not phosphoric acids.

Paperchromatographic studies were performed on the released fatty acids and the choline-lipids in the coagulated yolk buffer solution. As the results, it was found that the fatty acids released were mainly palmitic acid, stearic acid, and unsaturated acids (oleic acid, and linoleic acid). The spotting of the lysolecithin was also clearly detected on the chromatogram of the choline-lipids. The production of the lysolecithin may be due to the release of the fatty acids from the egg yolk phospholipids, lecithin.

From the above results, it was presumed that the coagulating enzyme was a kind of the 'Phospholipase-A' similar to those of snake venom active to the ester linkage with acyl group of the egg yolk phospholipids. Now it should be a notable fact that the snake venom acts on the phospholipids and releases only unsaturated or saturated

fatty acids and produces lysolecithin, in contrast to that the egg yolk coagulating enzyme releases both saturated and unsaturated fatty acids simultaneously and produces lysolecithin.

VIII. Mechanism of occurrence of coagulation

phenomena and factors which may be lethal to spermatozoa when coagulation occurred.

Chemical changes of egg yolk constituents accompanied by coagulation was clarified previously, and the mechanism of occurrence of physical changes such as turbidness and coagulation accompanied by chemical changes was examined. The results are as follows.

1. Mechanism of turbidness and coagulation was summarized as follows: Egg yolk phospholipid, lecithin was attacked by the coagulating enzyme and releases fatty acids, and one of the unsaturated fatty acids produced, oleic acid, causes turbidness by absorbing yolk oils that contained yolk color. Then, coagulation occurs after combination of oleic acid absorbed yolk oils and saturated fatty acids such as palmitic acid and stearic acid.

2. Effects of lysolecithin and fatty acids produced in the egg yolk buffer solution on the viability of spermatozoa was studied. It was found that a high

concentration of lysolecithin was harmful to sperm viability and respiration, and fatty acids at a concentration of 40-70 mM was severely harmful to the spermatozoa. It is probable that the products such as lysolecithin and fatty acids may be a main factor for the death of spermatozoa when coagulation occurred.

IX. Methods of preventing coagulation in goat semen diluted with egg yolk buffer solution.

From the results obtained through these studies, some methods for preventing coagulation in diluted goat semen were examined.

1. Spermatozoa once washed and freed from most of the seminal plasma, diluted with egg yolk buffer solution and stored at 4°C were not coagulated, and their motility was prolonged for about a week, and could be used for artificial insemination effectively.

2. Occurrence of coagulation, fatty acid production and sperm motility of diluted goat semen with buffer solution containing yolk fractions was examined for 10 days of preservation at 4°C. Coagulation occurred only in the semen diluted with yolk buffer solution and not in the one containing yolk powder, yolk protein, yolk neutral oils, or yolk phospholipids, and the semen diluted with yolk powder buffered solution shows the best result for preserving semen.